

ROSA DE JESUS BENTO SOARES

**Avaliação das Possibilidade de Tratamento de um
Efluente Piscícola Marinho por Microalgas**



DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA E ANTROPOLOGIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

JUNHO/2000

Rosa de Jesus Bento Soares

AVALIAÇÃO DAS POSSIBILIDADES DE TRATAMENTO DE UM EFLUENTE
PISCÍCOLA MARINHO POR MICROALGAS

**Dissertação de Mestrado em Hidrobiologia
apresentada à Faculdade de Ciências
da Universidade do Porto**

Porto 2000

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Teresa Borges do Departamento de Zoologia e Antropologia da (D.Z.A. da) F.C.U.P, que com todos os seus conhecimentos e experiência me sugeriu o tema do trabalho, me orientou com dedicação, carinho e amizade, apoiando-me em todas as fases do meu trabalho.

À Prof. Doutora e Amiga Aurélia Maria Saraiva, Departamento de Zoologia e Antropologia da (D.Z.A. da) F.C.U.P. pela sua amizade, longínqua, que mais uma vez se manifestou ao longo de todo este trabalho e pela sua ajuda tão preciosa nas fotografias das microalgas.

Ao Dr. Hussenot, Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture de L'Homeau (IFREMER- CNRS), França, pelos seus comentários que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Proprietário da piscicultura pela permissão da utilização do efluente para a realização dos ensaios experimentais.

Ao Biólogo responsável pela piscicultura pelas informações sobre o funcionamento desta.

Às equipas ITE-DER e ITA - LAACQ, INETI, Lisboa a colaboração prestada relativa às técnicas analíticas.

Ao Dr. Nuno Formigo pela ajuda prestada no tratamento estatístico dos dados.

À minha Amiga e colega de Mestrado Dr.^a Teresa Carvalho, por toda a companhia e ajuda ao longo da realização deste trabalho.

A todos os meus amigos e colegas, que de alguma forma me ajudaram, agradeço-lhes a sua contribuição.

A todos os funcionários da Estação de Zoologia Marítima especialmente à D. Adozinda e ao Sr. Pedro.

Finalmente ao meu Marido e Filhas (Bibiana e Mariana), por terem conseguido aguentar tanto tempo as microalgas.

Sumário

Neste estudo fez-se uma primeira caracterização de uma piscicultura marinha de produção de Pregado (*Scophthalmus maximus*) em regime intensivo, localizada no Norte de Portugal e uma avaliação das possibilidades de tratamento por microalgas deste tipo de efluente.

O estudo foi restringido a um conjunto de tanques de engorda dispostos em série. Seleccionaram-se três locais de amostragem: água que abastece a piscicultura; água de entrada nos tanques e efluente desse conjunto de tanques. Durante nove meses fez-se a caracterização físico-química das amostras avaliando-se os parâmetros: temperatura, salinidade, pH, oxigénio, amónia, nitritos, nitratos, fosfatos, silicatos, sólidos suspensos e pigmentos clorofilinos. Constatou-se que o regime hidráulico em que a piscicultura se encontrava no momento da colheita influenciava a composição do efluente. Assim, a concentração máxima para a amónia, nutriente principal na composição do efluente, foi detectada no mês de Junho (4,9 mg/L), quando a piscicultura estava a funcionar em circuito fechado. O mesmo se verificou para os fosfatos, com 0,66 mg/L. No restante período os valores observados variaram com o regime hidráulico (fechado, semi-fechado e aberto) para todos os nutrientes, e estiveram compreendidos entre: fosfatos - 0,25 e 0,55 mg/L; nitratos - 0,22 e 0,93 mg/L; amónia - 0,68 e 2,44 mg/L e nitritos - 0,05 e 0,17 mg/L. As razões atómicas entre os nutrientes principais (N:P) variaram entre 5:1 e 18:1. Os valores obtidos para os sólidos suspensos foram influenciados pela época do ano e pelas marés vivas, características da zona em que a piscicultura está localizada.

Numa perspectiva de tratamento biológico e valorização do efluente caracterizado, realizaram-se ensaios laboratoriais com três espécies de microalgas, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* e um *Flagelado* (espécie autóctone, do género *Tetraselmis*, isolada durante este trabalho). Para potenciar o desenvolvimento das microalgas, fizeram-se correcções da razão N:P:Si do Efluente, tendo-se observado densidades celulares de 45×10^4 cel/mL para *P. tricornutum*, 39×10^4 cel/mL para *T. suecica* e 45×10^4 cel/mL para o *Flagelado*. Obtiveram-se percentagens de remoção de azoto e fósforo superiores a 90% para a generalidade das espécies.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam boas perspectivas para a utilização de microalgas no tratamento de efluentes deste tipo.

Abstract

This work describes the first contribution to the knowledge of intensive turbot (*Scophthalmus maximus*) production effluents in North of Portugal. It also aimed at studying the possibilities of their biological treatment by microalgae.

The study was restricted to a set of tanks in series for fattening. Three sampling points had been chosen: water that supplies the fish farm; selected tank inlet water and effluent of this set of tanks. During nine months the following seawater physical and chemical parameters were evaluated: temperature, salinity, pH, oxygen, ammonia, nitrates, nitrites, phosphates, silicates, suspended solids and pigments.

It was shown that the hydraulics of the fish farm at the moment of sampling influenced the composition of the effluent. Thus, the maximum concentration of ammonia, main nutrient in the effluent, was found in the month of June (4,9 mg/L), when the fish farm was functioning in closed system. The same was verified for the phosphates with 0,66 mg/L. In the remaining period, the observed values varied with the hydraulic regimen (closed, semi-closed and open) for all of the nutrients, being: phosphates - 0,25 and 0,55 mg/L; nitrates - 0,22 and 0,93 mg/L; ammonia - 0,68 and 2,44 mg/L and nitrites - 0,05 and 0,17 mg/L. The atomic ratios between the main nutrients (N:P) changed from 5:1 to 18:1. Values for suspended solids were influenced by the season of the year and the spring tides characteristic of the region where the fish farm is located.

In a perspective of biological treatment and valorization of turbot effluents, laboratory assays with three microalgal species were performed. We used *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* and a *Flagellate* (autochthonous species, of the genus *Tetraselmis*, isolated during this work). To optimize the development of the microalgae, effluent N:P:Si ratios were corrected and cellular densities of 45×10^4 cel/mL for *P. tricornutum*, 39×10^4 cel/mL for *T. suecica* and 45×10^4 cel/mL for the *Flagellate* were obtained. The observed main nutrient removal rates were always greater than 90% for all of the species tested.

The results of this work show good perspectives in the biological treatment of this type of effluents by the use of microalgae.

Résumé

Dans cette étude eut lieu une première caractérisation d'une pisciculture marine intensive de turbot (*Scophthalmus maximus*) située au Nord du Portugal. On a aussi évalué les possibilités de traitement biologique de ce type d'effluents par des microalgues.

L'étude a été restreinte à un ensemble de trois bassins en série pour le grossissement. Trois points d'échantillonnage ont été choisis : l'eau d'arrivée à la pisciculture ; l'eau d'entrée dans les bassins et l'effluent de ce group de bassins. Pendant neuf mois on a suivi la qualité physico-chimique des échantillons pour les paramètres température, salinité, pH, oxygène, ammonium, nitrates, nitrites, phosphates, silicates, matières en suspension et pigments.

On a vu que le régime hydraulique où se trouvait la pisciculture au moment de l'échantillonnage avait une forte influence sur la composition des effluents. Dans ce cas la concentration maximale pour l'ammonium, nutriment dissous principal dans la composition de l'effluent, a été trouvée en juin (4,9 mg/L), quand la pisciculture devait fonctionner en circuit fermé. Le même se vérifia pour les phosphates avec 0,66 mg/L. Pour la restante période, les valeurs observés changeaient avec le fonctionnement hydraulique (fermé, semi-fermé et ouvert) pour tous les nutriments, et ont été compris entre: phosphates - 0,25 et 0,55 mg/L; nitrates - 0,22 et 0,93 mg/L; ammonium - 0,68 et 2,44 mg/L et nitrites - 0,05 et 0,17 mg/L. Les rapports entre les principaux nutriments (N:P) changeait de 5:1 à 18:1. Les valeurs obtenues pour les matières en suspension furent influencées par la saison et les marées de vives-eaux caractéristiques de la région où se trouve la pisciculture.

Dans une perspective de traitement biologique et de valorisation de l'effluent, des essais au laboratoire ont été menés avec trois espèces de microalgues : *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* et un *Flagellé* (espèce autochtone, du genre *Tetraselmis*, isolée pendant ce travail). Pour optimiser le développement des microalgues les rapports N:P:Si de l'effluent ont été corrigés et on a arrivé a des densités cellulaires de 45×10^4 cel/mL pour *P. tricornutum*, 39×10^4 cel/mL pour *T. suecica* et 45×10^4 cel/mL pour le *Flagellé*. Des taux d'épuration pour les nutriments dissous de plus de 90% ont été obtenus avec les microalgues essayées.

Les résultats de ce travail montrent de bonnes perspectives pour l'utilisation des microalgues dans le traitement biologique des effluents de pisciculture marine.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Microalgas.....	10
1.1.1. Cultura de microalgas marinhas.....	11
1.1.2. As microalgas no tratamento das água residuais.....	17
1.2. Aquacultura e poluição ambiental.....	19
1.2.1. Tratamento e valorização dos efluentes piscícolas.....	25
1.2.2. Direito de Ambiente e Aquacultura	26
1.3. Cultura do Rodovalho (pregado) <i>Scophthalmus maximus</i> L	27
1.3.1 Técnica de produção	29
1.3.2. Actividade fisiológica do Pregado e excreção de azoto e fósforo	31
1.4. Objectivos do trabalho efectuado	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Características gerais da Piscicultura estudada	35.
2.2. Locais de amostragem e tratamento das amostras	40
2.3. Microalgas utilizadas	42
2.3.1. As microalgas <i>Tetraselmis suecica</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	42
2.3.2. Indução de crescimento microalgal e isolamento de uma espécie autóctone designada por <i>Flagelado</i>	47
2.4. Sistema de cultivo das microalgas	.47
2.5. Meios de cultura utilizados	48
2.5.1 Meios sintéticos de referência	49
2.5.2. Processamento do efluente piscícola	49
2.6. Análises efectuadas	49
2.6.1. Análises nas amostras da piscicultura	50
2.6.2. Análises nas culturas das microalgas	51
2.7. Tratamento dos resultados	53
2.8. Tratamento estatístico	54
3. RESULTADOS	55
3.1. Ensaios preliminares	55
3.1.1. Resultados das análises preliminares	55
3.1.2. Efluente total da piscicultura em Janeiro e Fevereiro	56
3.1.3. Outros dados	56
3.1.4. Curvas de calibração	56
3.2. Características da piscicultura	58
3.2.1. Regime hidráulico	58
3.2.2. Caracterização dos tanques em estudo	59

3.2.3.	Caracterização físico-química das amostras da piscicultura	62
3.2.4.	Estimativas de produção de nutrientes e de matéria em suspensão nos tanques estudados	74
3.2.5.	Indução nutricional de crescimento de microalgas	78
3.3.	Ensaio com microalgas	80
3.3.1	Ensaio com <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	80
3.3.2.	Ensaio com <i>Tetraselmis suecica</i>	91
3.3.3.	Ensaio com o Flagelado	101
4.	DISCUSSÃO	
4.1.	Caracterização da Piscicultura	112
4.1.1.	Caracterização dos tanques em estudo	112
4.1.2.	Caracterização físico-química da água da piscicultura	114
4.2.	Ensaio com microalgas	120
4.2.1.	Ensaio com <i>P. tricornutum</i>	121
4.2.2.	Ensaio com <i>T. suecica</i>	125
4.2.3.	Ensaio com o Flagelado	129
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
6.	BIBLIOGRAFIA	141

1.INTRODUÇÃO

A poluição ambiental resultante das actividades domésticas, industriais e agro-industriais era, até há poucos anos, de natureza secundária em muitos países em desenvolvimento. Actualmente, esta poluição é considerada como geradora de problemas graves e com importantes implicações para a saúde pública e gestão dos recursos naturais. Assim, numa perspectiva de desenvolvimento sustentável, é urgente tratar os efluentes produzidos, mas mais urgente é trata-los bem e acima de tudo é preciso tratar para reutilizar e valorizar os mesmos.

Os efluentes são tratados em locais designados por ETARs (estações de tratamento de águas residuais) através de processos físicos, químicos e biológicos sendo os objectivos principais remover os sólidos, diminuir a concentração da matéria orgânica biodegradável, eliminar os organismos patogénicos e melhorar a qualidade da água tratada de forma a que esta possa ser reutilizada, ou pelo menos rejeitada com consequências mínimas para o meio ambiente. O desenvolvimento e a aplicação de um tratamento adequado ao tipo de efluente considerado é o primeiro passo para a protecção dos recursos hídricos.

As microalgas têm sido, desde há muito tempo, usadas no tratamento biológico de águas residuais por lagunagem. Neste processo, a matéria orgânica é degradada e estabilizada por bactérias em presença de oxigénio dissolvido, fornecido essencialmente pela actividade fotossintética das algas, (OLIVEIRA, 1995). É um processo aplicável a águas com origens muito diversificadas, urbanas e industriais mas que devem conter obrigatoriamente matéria orgânica e elementos nutritivos. Estes sistemas foram desenvolvidos para água doce, havendo poucos ensaios com água salgada (OSWALD, 1988 ; METCALF & EDDY, 1991). A lagunagem constitui uma das técnicas mais simples e menos dispendiosas de tratamento biológico de águas residuais e também tem sido utilizado em Portugal (OLIVEIRA, 1995).

A Aquacultura é uma actividade em expansão geradora de formas de poluição, que é necessário limitar para a conservação dos recursos hídricos. A utilização de grandes massas de água, grandes áreas de terreno e grandes cargas animais nas pisciculturas

têm contribuído para que, nos últimos anos, a Aquacultura seja identificada como uma actividade poluidora, podendo deste modo contribuir para a poluição do meio para onde são lançados os efluentes produzidos.

Os efluentes piscícolas são caracterizados por valores elevados de materiais, especialmente inorgânicos. Estes efluentes constituem uma fonte de nutrientes, azotados e fosfatados, valiosa para a produção em massa de microalgas. Assim, a sua utilização como meio de cultura, apresenta vantagens, na medida em que as microalgas, através do processo fisiológico de assimilação, contribuem para reduzir a carga dos nutrientes nesses efluentes e minimizar o impacte ambiental das descargas das pisciculturas. A biomassa assim obtida pode ser utilizada em sistemas de aquacultura integrada como fonte de alimento para peixes, crustáceos e moluscos (SHPIGEL *et al.*, 1993) e produção de substâncias químicas de alto valor económico (OTERO, 1994).

A aplicação de processos biotecnológicos aos efluentes piscícolas terá efeitos positivos na qualidade do ambiente, pela redução da poluição (volume e carga) lançada para o ambiente. Através da reutilização, reciclagem e valorização destes efluentes contribui-se para uma gestão racional e integrada dos recursos naturais.

No presente trabalho procurou-se caracterizar e utilizar o efluente proveniente de um conjunto de tanques de produção de Pregado ("Rodvalho") em regime intensivo, numa perspectiva de tratamento, reutilização e valorização do mesmo através da cultura de microalgas marinhas. Testaram-se espécies conhecidas e ainda uma microalga isolada na zona da piscicultura em estudo.

1.1. Microalgas

As microalgas são seres unicelulares eucariontes, com 1-2 μm a 500 μm , coloniais ou não, e que possuem uma maquinaria fotossintética muito eficiente que converte energia solar em biomassa. Estes microrganismos apresentam elevadas taxas de produção, adaptabilidade a diferentes condições ambientais e são omnipresentes em

qualquer meio aquático onde exista uma fonte de carbono, nutrientes e luz suficiente, assim como condições de temperatura adequadas (SHELEF & SOEDER, 1980 *in* OTERO, 1994).

As microalgas são utilizadas em várias situações como se pode observar na figura 1.1.

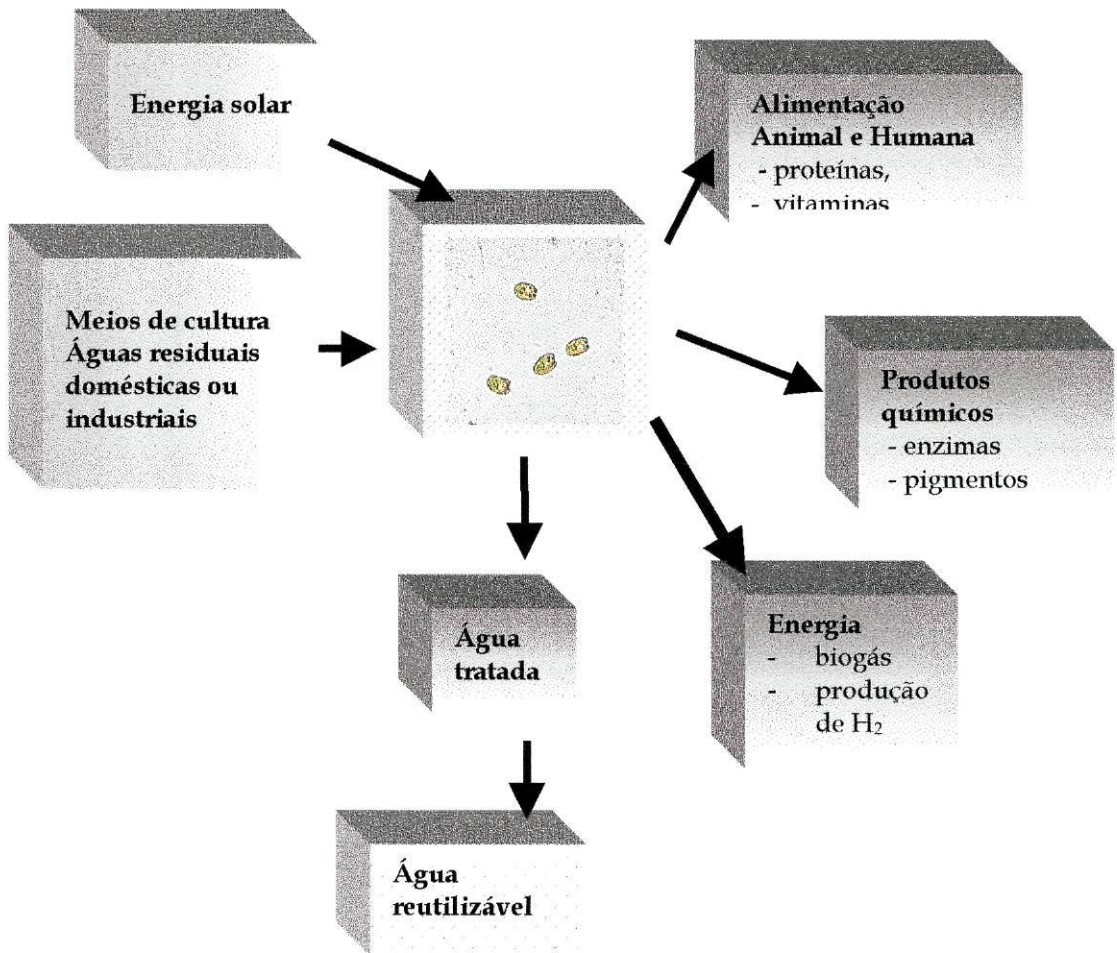


Figura1.1. Diferentes utilizações das microalgas

1.1.1. CULTURA DE MICROALGAS MARINHAS

A taxa de crescimento das microalgas é influenciada por vários factores como a intensidade luminosa, o fotoperíodo, a temperatura, o pH, a salinidade, a concentração dos nutrientes, a agitação do meio, o tamanho do inóculo, a natureza do meio de cultura, a precipitação, a evaporação e a contaminação.

Efectua-se de seguida uma breve análise dos parâmetros de cultura mais relevantes:

LUZ

A luz é um factor fundamental para a cultura de microalgas, quer pela sua acção (fonte de energia para a fotossíntese) quer pelas relações com os outros parâmetros. A radiação utilizada na fotossíntese está dentro do espectro visível da luz (400-700 nm). A intensidade luminosa, o fotoperíodo e o comprimento de onda têm influência sobre o crescimento das microalgas. Assim, variações na intensidade luminosa influenciam as taxas de crescimento (MORTAIN-BERTRAND *et al.*, 1987; WALSH, 1988); o volume celular (OSBORNE & RAVEN, 1986), as necessidades nutritivas (WYNNE & RHEE, 1986), a assimilação do azoto (TERLIZZI & KARLANDER, 1980) a actividade enzimática (DIONISIO *et al.*, 1989a, 1989b), e a composição bioquímica (DUBINSKY *et al.*, 1986).

TEMPERATURA

É grande a diversidade no que diz respeito à tolerância a variações de temperatura por parte das microalgas. A temperatura mínima a que ainda ocorre a fotossíntese depende da espécie. Na tabela 1.1 podem observar-se os valores de temperatura para o crescimento de algumas espécies de microalgas marinhas.

Tabela 1.1. Temperatura de crescimento de algumas microalgas marinhas (VEGA, 1998).

ESPÉCIE	TEMPERATURA DE CRESCIMENTO
<i>Skeletonema costatum</i>	12 - 30°C
<i>Isochysis galbana</i>	3 - 28°C
<i>Tetraselmis suecica</i>	22 - 26°C
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	15 - 23°C

AGITAÇÃO

A agitação do meio de cultura é necessária e incide directamente sobre o crescimento das microalgas (RICHMOND, 1986b; 1990; RAVEN, 1988; LAING & AYALA, 1990; BECKER, 1994).

A agitação produz movimento na água o que implica uma série de efeitos positivos, dos quais se salientam os seguintes:

- distribuição homogénea das células e dos nutrientes dentro da cultura;
- melhoramento da distribuição da luz e das células, permitindo que estas estejam fotossinteticamente activas,
- evitar que as células sedimentem no fundo do recipiente de cultura, produzindo uma estimulação do metabolismo celular;
- diminuir a tensão de oxigénio na cultura;
- prevenir a estratificação térmica

pH

As microalgas apresentam uma grande dependência do pH do meio de cultura. Cada microalga apresenta um pH óptimo de cultura que se situa entre 7 e 8.

Uma descida de pH pode ser letal ; pelo contrário um aumento de pH causa menos efeitos drásticos mas pode levar à precipitação de nutrientes fosfatados e a uma deficiência em alguns elementos traço (RICHMOND, 1986).

O pH do meio determina a solubilidade do dióxido de carbono e dos minerais, assim como a distribuição das formas inorgânicas de carbono (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-}), influenciando, deste modo, directamente o metabolismo das microalgas .

A assimilação de nitrato (NO_3^-) e amónia (NH_4^+) está estritamente relacionada com o pH observado no meio. Assim, a assimilação de nitrato tende a fazer aumentar o pH, enquanto que a utilização de amónia como única fonte de azoto pode provocar uma rápida diminuição deste, causando efeitos colaterais (BREWER & GOLDMAN, 1976).

SALINIDADE

Existe tolerância a diferentes valores de salinidade podendo esta variar entre 8 e 40 ‰ . Na tabela 1.2 podem observar-se os valores de salinidade óptima para o crescimento para algumas microalgas marinhas.

Tabela 1.2. Salinidade de crescimento de algumas microalgas marinhas (VEGA,1998)

ESPÉCIE	SALINIDADE (‰)
<i>Skeletonema costatum</i>	35
<i>Tetraselmis suecica</i>	36
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	35

NUTRIENTES

Para um crescimento óptimo devem incluir-se no meio de cultura nutrientes em quantidades adequadas. Os valores de concentração a utilizar dependem das espécies e dos factores ambientais como luz, temperatura e pH. Assim,

O *carbono* é o macronutriente mais importante e constitui cerca de 50% da biomassa microalgal. O crescimento microalgal é limitado pela fonte de carbono, podendo esta ser orgânica ou inorgânica. A fonte principal deste elemento é o dióxido de carbono (CO₂) apesar de algumas espécies, como *Tetraselmis suecica*, poderem utilizar o carbono orgânico (KAPLAN *et al.*, 1986).

O *azoto* é, depois do carbono, o elemento que tem uma maior expressão na composição bioquímica das microalgas. A fonte de azoto utilizável pode ser inorgânica (nitritos, nitratos e amónia, ANTIA *et al.*, 1985; KAPLAN *et al.*, 1986), embora por vezes possa ser empregue o azoto orgânico, sendo o composto mais utilizado a ureia (NEILSON & LARSON, 1980).

O azoto é assimilado preferencialmente sob a forma de azoto amoniacal (MAESTRINI & ROBERT, 1981). Quando este está presente sob a forma oxidada de nitrato e nitrito, tem de ser reduzido antes de ser incorporado nas moléculas orgânicas.

Quando a uma cultura microalgal se adiciona amónia e nitrato como fonte de azoto, o nitrato não é normalmente utilizado até que toda a amónia seja consumida. A preferência da amónia relativamente ao nitrato está associada a uma economia de energia pois, como referido anteriormente, a incorporação de nitrato implica a sua redução a nitrito e depois a amónia, enquanto que esta é incorporada directamente nas moléculas orgânicas (SYRETT, 1981; BERTL *et al.*, 1984; ULRICH *et al.*, 1984).

Algumas microalgas são sensíveis a concentrações elevadas de amónia e valores da ordem de 1mM podem inibir o seu crescimento. Quando se utiliza amónia como única fonte de azoto, a incorporação desta pelas microalgas é acompanhada por uma

produção de iões H^+ (Ulrich *et al.*, 1984) provocando uma descida no pH do meio, conforme já foi referido anteriormente.

Algumas espécies podem utilizar o azoto sob a forma de nitritos, embora estes não sejam tão abundantes como as outras formas de azoto inorgânico. A assimilação dos nitritos ocorre por redução dos nitritos a amónia, a qual é depois convertida em compostos orgânicos (SYRETT, 1981). O nitrito, em concentrações elevadas, pode inibir o crescimento (MORRIS, 1974; CRESSWEL & SYRETT, 1982).

A capacidade de utilização do azoto sob a forma orgânica está amplamente difundida na maioria das microalgas. A *ureia* é uma boa fonte de azoto para quase todas elas (SYRETT, 1987) e o crescimento obtido para algumas espécies capazes de a utilizar é semelhante ao que se obtém com fontes inorgânicas (KAPLAN *et al.*,1986;). A *ureia* é convertida em amónia para poder ser transformada em material celular .

A capacidade de utilização das diversas fontes de azoto varia com as espécies e tem gerado controvérsia. A microalga *Phaeodactylum tricornutum*, por exemplo, apresenta crescimento semelhante com nitrato, nitrito e *ureia* como fontes de azoto; porém, o crescimento foi significativamente inferior com amónia (FIDALGO *et al.*, 1990). No entanto, estudos mais recentes (MOREAU *et al* 1998) referem que *P. tricornutum* é uma diatomácea que suporta valores elevados de amónia, pois a toxicidade do azoto amoniacal para esta alga é observada só a partir de 9-10 mM/L.

O *fósforo* é utilizado por todas as microalgas sob a forma de *fósforo* inorgânico (DROOP, 1969), verificando-se haver uma proporcionalidade directa entre a absorção deste elemento e a concentração de clorofila *a* (BOYD & MUSIG, 1981). Há microalgas que, na ausência de *fósforo* inorgânico, utilizam *fósforo* orgânico na forma de fitina e glicerolfosfato, sendo *Phaeodactylum tricornutum* um exemplo dessas algas. Estudos realizados por KUENLZER,1970 *in* BONIN & MAESTRINI (1981) indicam que as diatomáceas são o grupo mais eficiente na utilização do *fósforo* orgânico.

As microalgas conseguem metabolizar o fósforo orgânico na presença de fosfatases, tendo sido estas enzimas identificadas em 27 espécies de microalgas (BONIN & MAESTRINI, 1981).

O azoto e o fósforo, além de serem necessários em determinadas quantidades para que se obtenha uma taxa de crescimento eficiente, também são exigidos pelas microalgas numa proporção correcta entre si. A razão N:P (átomo: átomo) óptima é específica para cada espécie e pode variar de 5:1 a 30:1 (WILKFORS,1986).

Os *micronutrientes* são requeridos em concentrações baixas e em excesso são tóxicos. O ferro, é imprescindível para o metabolismo do azoto, fotossíntese e síntese de citocromos. O magnésio e o cobre fazem parte da cadeia transportadora de electrões e são cofactores de muitas enzimas . O molibdeno é necessário para a assimilação do azoto. O cobalto é necessário para as microalgas que sintetizam vitamina B₁₂ . As que não sintetizam não requerem cobalto mas sim a própria vitamina, sendo necessário, por vezes, também adicionar outras, como a tiamina e a biotina.

Além dos elementos que são comuns a todas as microalgas, alguns grupos podem ter necessidades específicas, como as diatomáceas, que necessitam silício (ABALDE *et al.* 1995).

REGIMES DE CULTURA

Existem basicamente três tipos de regime para a cultura de microalgas, que são:

Regime estagnante ou batch, o Regime semi - contínuo e Regime contínuo. Seguidamente, apresentam-se as características principais destes três regimes.

- *estagnante* ou *batch* - regime de cultura em que não ocorre renovação do meio. A população microalgal passa pelas diferentes fases de crescimento características (latência, exponencial e estacionária, ABALDE *et al.*, 1995). Este regime de cultura é o adequado para o estudo da cinética do crescimento e dos factores que a

O regime estagnante é o primeiro a ser utilizado quando se pretende fazer um estudo de crescimento contínuo ou semi - contínuo de microalgas;

- *semi- contínuo* - parte do volume da cultura é retirado no final da fase exponencial e a quantidade que se retira é substituída por meio de cultura fresco. (ABALDE *et al.*, 1995). Este tipo de regime permite manter culturas no interior, para a produção de microalgas durante várias semanas, podendo as condições de cultura ser controladas diariamente. Pode também ser utilizado para a indução de "blooms" de espécies naturais, marinhas ou de água doce (DUNSTAN & TENORE, 1972; DICKSON, 1987).
- *contínuo* - neste regime de cultura é necessário adicionar continuamente nutrientes com a mesma frequência com que são retirados do meio para manter os parâmetros de crescimento e a população a um nível constante. A população mantém-se na fase exponencial de crescimento durante longos períodos de tempo. O factor que controla o crescimento é a taxa a que se adiciona o meio fresco (ABALDE, *et al.*, 1995). Uma das vantagens deste regime é de que amostras retiradas em tempos diferentes são idênticas.

MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados para a produção de microalgas podem ser :

- ▶ completamente sintéticos;
- ▶ baseados em águas naturais enriquecidas com minerais;
- ▶ águas residuais provenientes de várias origens, ricas em matéria orgânica e compostos azotados e fosfatados.

1.1.2. AS MICROALGAS NO TRATAMENTO DAS ÁGUAS RESIDUAIS

As microalgas fazem parte da comunidade biótica que se desenvolve nos sistemas de tratamento por lagunagem. Este grupo de organismos, conjuntamente com bactérias, protozoários e outros, constituem a comunidade existente neste tipo de meio. O funcionamento destes sistemas baseia-se na complementaridade de processos metabólicos entre as populações bacterianas, que mineralizam a matéria

orgânica, e as microalgas, que utilizam como nutrientes os produtos dessa degradação.

As microalgas intervêm essencialmente nos processos biológicos que ocorrem nas lagoas de estabilização clássicas (lagoas facultativas e de maturação) e lagoas fotossintéticas de alta carga (LFAC). As lagoas de estabilização clássicas são utilizadas quando se pretende efectuar essencialmente o tratamento de efluentes e as LFAC são utilizadas não só para o tratamento dos efluentes, como também para a produção de biomassa (OLIVEIRA,1995).

Entre as várias funções realizadas pelas microalgas nestes sistemas destacam-se as seguintes:

- produção de oxigénio molecular, através do processo da fotossíntese. Este irá contribuir para que se verifique a degradação da matéria orgânica dos efluentes pelas bactérias aeróbias e outros microorganismos aí presentes;
- acumulação e conversão dos nutrientes metabolizados por bactérias aeróbias, principalmente compostos azotados e fosfatados, em biomassa microalgal (DE PAW & VARENBERGH,1981 *in* MOREIRA 1996).
- alteração das condições químicas do meio de cultura, em função da utilização do CO₂ na fotossíntese. Esta utilização implica um aumento nos valores do pH, e conseqüente diminuição dos teores de fosfato e amoníaco do meio. Os fosfatos precipitam e o amoníaco liberta-se para a atmosfera (OSWALD,1988 ; RODRIGUES & SANTANA, 1993).
- intervenção na redução dos odores desagradáveis das águas residuais provenientes da degradação da matéria orgânica, não só pelo facto de criarem condições alcalinas no meio, mas também porque eliminam sulfureto de hidrogénio, mercaptanos e ácidos gordos voláteis (OLIVEIRA,1995).
- em condições de intensidade luminosa limitante, algumas microalgas têm a capacidade de alterar o seu metabolismo autotrófico para heterotrófico, realizando a assimilação de algumas moléculas simples como aminoácidos, ureia, açúcares simples (LALIBERTE *et al.*, 1994), o que permite a sua utilização no tratamento de efluentes e subprodutos com características adequadas, como já foi referido.

Os sistemas de tratamento com microalgas foram durante muitos anos utilizados apenas para águas residuais domésticas e agro-industriais em água doce . Actualmente, começam a surgir estudos em que microalgas marinhas são utilizadas para o tratamento de efluentes piscícolas, por exemplo (LEFEBVRE *et al.*,1996 ; CRAGGS, 1997; HUSSENOT *et al.*, 1998 ; BORGES & MOREIRA, 1999 ; BORGES *et al.*, 2000) proporcionando a possibilidade de reutilização da água nas pisciculturas, de modo a funcionarem em sistema praticamente fechado, e simultaneamente a obtenção de biomassa algal que poderá ser utilizada em culturas integradas (HUSSENOT *et al.* 1998).

1.2. Aquacultura e poluição ambiental

A aquacultura é uma actividade que a nível mundial tem vindo gradualmente a aumentar de importância, particularmente nestas duas últimas décadas. Segundo a FAO (1999) a aquacultura representou 23,2% da produção pesqueira mundial em 1997, comparada com apenas 13% de 1990, em que 17,3 milhões de toneladas tiveram origem em águas doces e 11,14 milhões de toneladas em águas salgadas . A manter-se este volume de pescado, a FAO na previsão efectuada para o ano 2010, indica uma procura mundial de produtos de aquacultura de cerca de 35 a 40 milhões de toneladas, compreendendo peixes, crustáceos e moluscos.

Em Portugal, a aquacultura está distribuída por todo o país, de norte a sul. Esta actividade tem apresentado um grande desenvolvimento e representa actualmente 5 % do total da produção pesqueira nacional (DGPA, 1997). A piscicultura foi o sector em que esse aumento foi mais notório, não só pelos valores de produção, mas também pelo número de espécies actualmente produzidas, entre as quais se destacam a dourada (*Sparus auratus*) e o Robalo (*Dicentrarchus labrax*), em regime semi - intensivo, e o Pregado (rodovalho) (*Scophthalmus maximus*) em regime intensivo.

Em aquacultura utilizam- se basicamente três metodologias de produção: *regime extensivo*, *regime semi- intensivo* e *regime intensivo* (MORALES,1991).

Seguidamente, apresentam-se as principais características de cada uma das metodologias referidas

Regime extensivo Sistema de produção mais antigo que aproveita quase exclusivamente as condições naturais disponíveis. O controlo sobre o sistema é quase inexistente;

Regime semi-intensivo Nível de controlo baixo sobre o sistema de produção, devido à variabilidade das condições do meio natural. Cargas utilizadas mais elevadas do que no regime anterior. Recorre-se à reprodução artificial para a obtenção de ovos e juvenis. Na fase de engorda é fornecido aos animais, além de alimento natural, alimento artificial complementar para aumentar o rendimento desta fase de crescimento;

Regime intensivo Caracterizado pela utilização de cargas elevadas, com um acompanhamento muito rigoroso da cultura. Todos os parâmetros de produção estão sob observação permanente. A espécie cultivada é alimentada exclusivamente com alimento artificial. Recurso a frequente a metodologias de manejo, como calibragens. As tecnologias de reprodução e do crescimento, são geridas de forma a permitir controlar todo o ciclo, podendo chegar-se à independência total das condições naturais e à progressiva melhoria genética da produção.

Um sistema de cultura, na sua forma mais simplificada, é constituído por um filtro, para o tratamento da água, e pelos tanques onde se encontram os animais. Aos tanques adiciona-se o alimento e oxigénio necessário à cultura.

A água pode utilizar-se em *sistema aberto* ou em *sistema fechado*, como se pode observar na representação esquemática apresentada na figura 1.2.

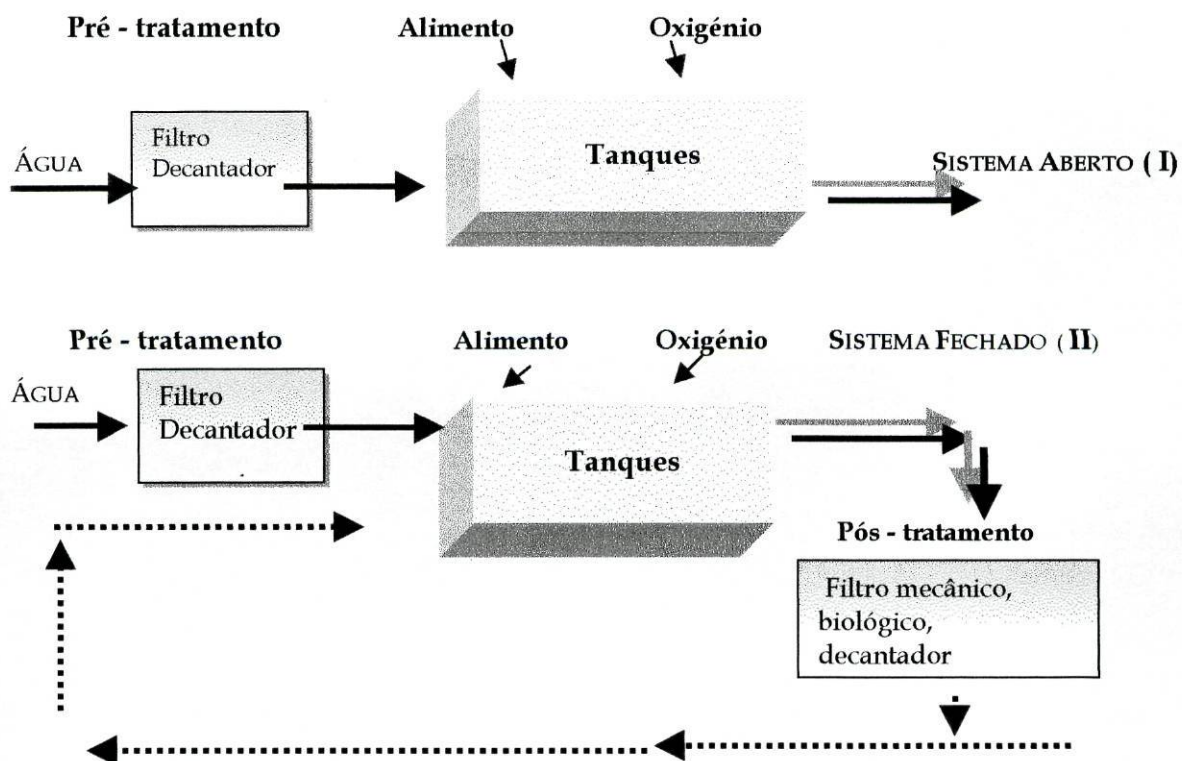


Figura 1.2 Representação esquemática do trajecto efectuado pela água em sistema aberto (I) e em sistema fechado (II).

Na prática, não existem sistemas completamente fechados, pois há sempre necessidade de renovar a água periodicamente. Neste sistema a água é reciclada repetidamente e, antes de se recircular a água, esta deve ser sujeita a um tratamento para eliminar ou minimizar todas as alterações que nela se tenham produzido

As necessidades em água das pisciculturas dependem da espécie a cultivar e do tipo de regime. O regime intensivo necessita de maior número de renovações diárias de água do que os outros regimes, em que a renovação é de cerca de 33% por dia (HUSSENOT, 1998). Quando se compara, por exemplo, o dispêndio de água que ocorre na produção de robalo em regime semi-intensivo e em regime intensivo (tabela 1.3.) podemos constatar que neste último, o gasto de água é significativamente superior.

Tabela 1.3..Características da gestão da água em pisciculturas marinhas, expressa como percentagem de volume de água renovada (Adaptado de HUSSENOT, 1998)

ESPÉCIE	REGIME	FREQUÊNCIA	RENOVAÇÃO (% POR DIA)
Robalo	Semi - intensivo	Diária	33
Robalo	Intensivo	Diária	600
Pregado	Intensivo	Diária	900

Na tabela 1.3 podemos ainda verificar que a taxa de renovação de água necessária para a cultura intensiva do pregado, é muito superior à do robalo.

Da actividade aquícola resultam *efluentes*, nomeadamente das pisciculturas marinhas em regime intensivo, caracterizados por elevadas concentrações de materiais particulados e dissolvidos, estes, essencialmente compostos de azoto e fósforo cuja eliminação provoca vários problemas. A carga poluidora deste tipo de efluentes depende, entre outros factores, da alimentação fornecida aos animais. Quando comparamos a quantidade de alimento que entra no sistema, a produção de peixe obtida e a composição do efluente lançado para o ambiente, podemos constatar que ocorrem grandes perdas de azoto e fósforo para o meio receptor, como se pode observar na figura 1.3.

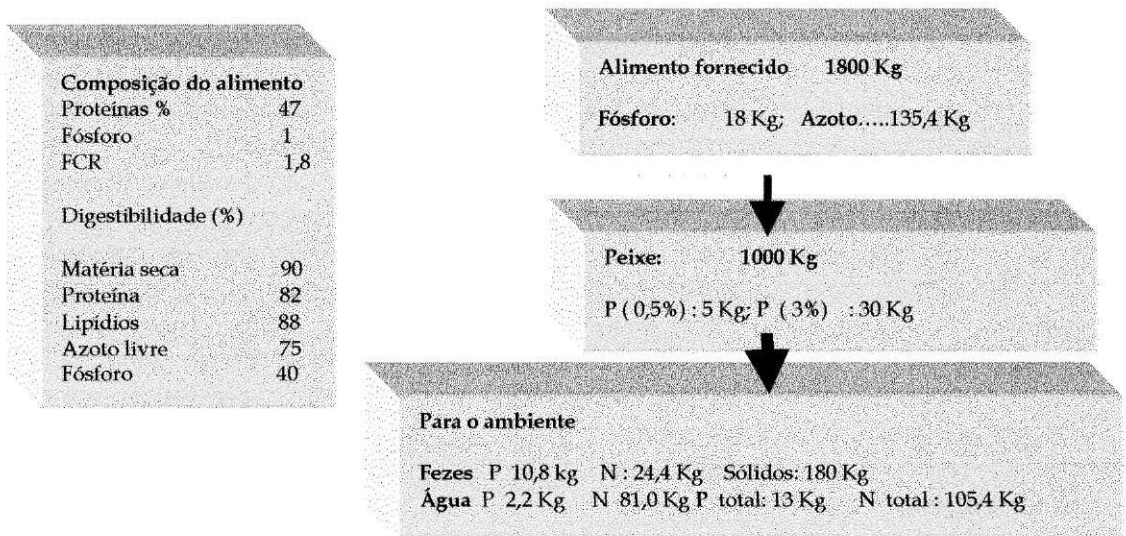


Figura 1.3. Características de alimento fornecido e perdas de azoto e fósforo (em Kg) por tonelada de peixe produzido (adaptado de ALVARADO,1997)

Os efluentes das pisciculturas, embora constituam uma fonte localizada de poluição, têm a particularidade de serem geralmente libertados para o meio de uma forma difusa, sendo a poluição resultante difícil de prever, quantificar e controlar.

Em termos de exploração piscícola interessa, essencialmente, os efeitos que os excreta causam sobre os próprios peixes: a toxicidade do amoníaco, por exemplo, em sinergia com outros factores que influenciam o metabolismo, provoca um efeito negativo sobre as características zootécnicas e sobre os resultados técnicos da exploração. Daí que os efluentes das pisciculturas devam ser caracterizados de maneira exacta e geridos em paralelo com a sensibilidade do meio receptor (DOSDAT,1992).

A necessidade de rentabilizar as explorações leva a que sejam utilizadas densidades de cultivo elevadas. Assim, são rejeitados efluentes em grande quantidade, aumentando o seu impacto sobre o ambiente. Na figura 1.3. apresentam-se os principais efeitos de uma cultura intensiva sobre o ambiente.

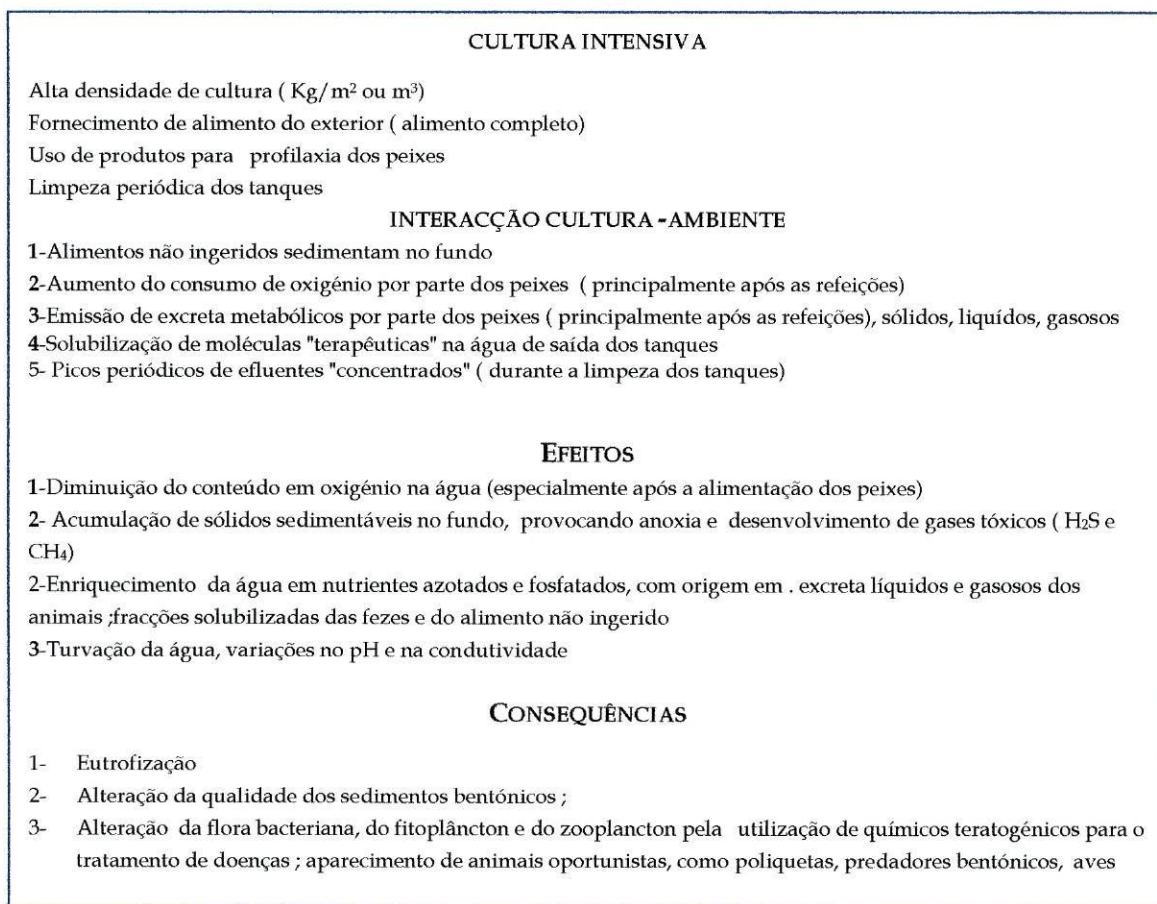


Figura 1.3- Efeitos da aquacultura intensiva no ambiente (Adaptado de BALLESTRAZZI,1996

Numa perspectiva de cada vez mais se minimizarem os efeitos das indústrias para o meio ambiente, é preciso, e seguindo a política dos três R's (reduzir, reutilizar, reciclar), fazer o controlo das fontes de poluentes, com vista à redução da poluição na origem. Assim, algumas medidas, que poderão vir a ser integradas num " código de boas práticas piscícolas" para reduzir o impacto ambiental das pisciculturas e minimizar os dispêndios de água estão relacionadas com o funcionamento destas, das quais se destacam: o regime alimentar ; a melhoria dos índices de conversão do alimento ; a utilização de alimentos não poluentes; a redução dos desperdícios de peixes; a recolha de fezes e de restos de alimento; o controlo da utilização de antibióticos e produtos afins; o tratamento da água e a implementação crescente de sistemas com recirculação de água.

A reutilização dos efluentes piscícolas apresenta vantagens quer na economia da piscicultura quer no impacto ambiental que esta provoca no meio. Economicamente reduz-se a quantidade de água a utilizar, pois a reutilização da água permite que as pisciculturas possam funcionar em regime de circuito semi- fechado e fechado. Em termos ambientais está-se a contribuir para uma diminuição da carga poluente dos efluentes quando estes são lançados no meio receptor. A recirculação dos efluentes contribui também para diminuir a dependência das piscicultura do regime de marés, característica generalizada das piscicultura marinhas.

Através da *redução, reutilização, reciclagem e valorização* destes efluentes contribui-se para uma gestão racional e integrada dos recursos naturais.

Por outro lado, a utilização de aquacultura integrada pode contribuir para minimizar os dispêndios de energia e os impactos ambientais desta actividade humana (FOLKE & KAUTSKY, 1992; HOPKINS *et al.*,1993; SHPIGHEL *et al.*,1993).

1.2.1. TRATAMENTO E VALORIZAÇÃO DOS EFLUENTES PISCÍCOLAS

Embora a concentração dos compostos que constituem os efluentes piscícolas varie consoante o tipo de produção e a área de produção, estes são essencialmente os mesmos pelo que o tipo de estação de tratamento para os efluentes pode ser similar. No entanto, o tratamento poderá ser diferente consoante o volume de água a tratar (PILLAY, 1992).

Assim, no tratamento dos efluentes utilizam-se métodos que visam prevenir a depleção do oxigénio, a acumulação da matéria orgânica e matéria azotada inorgânica, particularmente a amónia, e do dióxido de carbono, pois são estes os parâmetros que mais afectam a qualidade dos efluentes piscícolas (MUIR, 1992 *in* VAN RIJN, 1996). Os métodos mais utilizados recorrem a processos físicos e a processos biológicos. Seguidamente, indicam-se alguns dos métodos referidos:

- *Métodos físicos* - o tratamento é baseado essencialmente na remoção de sólidos, sendo efectuado por sedimentação ou por filtração mecânica (CHEN & MALONE, 1991 *in* VAN RIJN, 1996) ;
- *Métodos biológicos* - neste tratamento considera-se os processos em que intervêm seres vivos tais como bactérias (filtros biológicos) (WHEATON *et al.*,1991), macroalgas (NAEGEL,1977; SUTTON & LEWIS,1982; ZWEIG,1986; RENNERT & DREWS,1989; RAKOCY *et al.* 1989; QUILLERE *et al.* 1993, SHPIGEL *et al.*,1993; SHPIGEL & NEORI,1996; NEORI & KROM,1996), moluscos (VAN RIJN, 1996), microalgas (HUSSENOT & LEFEBVRE,1996; GRAGGS, 1997; BORGES & MOREIRA, 1999; BORGES *et al.*, 2000) e cianobactérias (DUMAS, 1998).

Também pode ser incluído tratamento por métodos químicos, (ozone e ultravioletas) embora estes sejam muito dispendioso.

Nas pisciculturas em que se efectua reutilização da água, o que é mais corrente é que os sistemas de tratamento dos efluentes incluam sedimentação seguida de remoção de nutrientes por tratamento biológico, pois este processo parece ser o mais prometedor e praticável para os efluentes com esta origem (PILLAY,1992).

Assim, as partículas em suspensão são facilmente eliminadas pelos processos de sedimentação em tanques (tratamento físico), mas este processo é pouco eficaz no que diz respeito aos materiais dissolvidos, azoto e fósforo (HUSSENOT *et al.*,1995). Para eliminar estes compostos dissolvidos, e em particular o azoto e o fósforo mineral, uma solução é a da sua assimilação por microalgas, técnica que é utilizada em água doce (OLIVEIRA, 1995; LINCOLN & EARLE, 1990 *in* LEFEBVRE, 1996), para o tratamento de águas residuais urbanas e começa agora a ser utilizada para água salgada, como já se referiu anteriormente.

Os efluentes piscícolas produzidos através de sistemas intensivos, representam uma potencialidade económica a explorar, na medida em que possuem azoto e fósforo que podem ser utilizados por outros organismos com interesse comercial (MOZES & GORDIM, 1992). Atendendo a que o azoto e fósforo são nutrientes essenciais para o crescimento de microalgas, pode recorrer-se à utilização destes efluentes para a cultura das mesmas, reduzindo assim os custos de produção das microalgas, tendo em conta que os meios de cultura clássicos são geralmente muito onerosos. A utilização das microalgas permitirá o tratamento biológico dos efluentes, através da remoção dos azoto e do fósforo, bem como a obtenção de biomassa microalgal com interesse económico (DE PAUW, 1981).

1.2.2 DIREITO DO AMBIENTE E AQUACULTURA

A aquacultura europeia é essencialmente do tipo intensiva (LE ROUX, 1994). Nos países escandinavos, por exemplo, a tradição piscícola e o grau de intensificação da produção colocam sérios problemas de poluição. A situação é de tal maneira crítica que em alguns casos as normas legislativas aplicadas apenas tentam remediar o

problema. A Dinamarca é um dos países em que, para além da melhoria da digestibilidade dos alimentos, foram propostas medidas restritivas em relação à quantidade e qualidade de alimento fornecido, sendo as quotas atribuídas condicionadas pelas condições ambientais e pelos sistemas de tratamento de águas utilizados (JENSEN, 1991 *in* GOMES & REMA,1996).

Em França, a adopção de medidas regulamentares e o controlo da qualidade da água estão directamente relacionado com as características (qualidade e quantidade) do alimento utilizado, e /ou com o tipo de tratamento de águas residuais.

Relativamente a Espanha, um dos países em que a aquacultura está também muito desenvolvida, são apontados os parâmetros reguladores seguintes:

- Carência Bioquímica do Oxigénio (CBO) deve ser inferior a 10mg/L.
- Os Sólidos Suspensos Totais (SST) não podem ser superiores a 20% do nível existente na área da piscicultura
- A temperatura não pode exceder mais do que 3°C do valor verificado naturalmente. (GOMES & REMA, 1996)

Em Portugal, o Decreto Lei n.º 261/89 de 17/08/89, define as condições gerais a que deve obedecer a instalação dos estabelecimentos de culturas marinhas que utilizam águas salgadas ou salobras, assim como estabelece os respectivos regimes de autorização de instalações. Embora Portugal não possua até à data legislação específica para este tipo de indústria, são utilizados como referenciais os valores indicados no Decreto Lei n.º152/97 de 19 de Junho de 1997 e no Decreto Lei n.º236/98 de 8 de Agosto de 1998, relativos a águas residuais industriais.

1.3. A cultura do pregado (rodovalho) *Scophthalmus maximus* L.

Apesar da cultura do Pregado não fazer parte dos objectivos deste trabalho, a caracterização efectuada dos seus efluentes requer uma breve referência à sua biologia geral e produção em Portugal.

O pregado *Scophthalmus maximus* L., é um dos principais peixes planos com interesse económicos na Europa. A produção europeia de pregado foi de 400 toneladas em 1989, 1800 toneladas em 1993 e 4000 toneladas em 1996.

Portugal apresenta na costa Atlântica norte e centro, condições óptimas para o cultivo de pregado (GOUVEIA, 1995). A produção industrial desta espécie iniciou-se no norte do país e é realizada actualmente em três unidade de piscicultura. Estas unidades localizam-se em terra e a espécie é explorada em regime de monocultura intensiva, com cargas que atingem as várias dezenas de quilos por metro quadrado.

Os ciclos de produção compreendem a pré - engorda de juvenis adquiridos a maternidades, ou a sua produção na própria unidade, e a engorda até ao tamanho comercial, sempre superior a um quilograma, o que se verifica após cerca de um ano de cultivo partindo de juvenis de 10 gramas (PERSON - LE RUET, 1992)

A produção de pregado em Portugal foi, no norte e centro, de 215 toneladas em 1997 (Direcção Geral de Pescas e Aquacultura, DGPA,1999).

BIOLOGIA E ECOLOGIA DA ESPÉCIE

Posição Sistemática

Phylum	CHORDATA
SubPhylum	VERTEBRATA
SuperClasse	PISCES
Classe	OSTEICHTHYES
SubClasse	Actinopterygii
SuperOrdem	Teleosteos
Ordem	Pleuronectiformes
Família	Scophthalmidae
Genéro	<i>Scophthalmus</i>
Espécie	<i>Scophthalmus maximus</i> (Rafinesque, 1810)

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

O pregado é um peixe plano que se caracteriza por apresentar um corpo de forma aproximadamente oval, quase circular, de simetria dorsoventral. No estado adulto é

um peixe bêntico com a face direita despigmentada e cega virada para o fundo. O tamanho mais comum de pesca é de cerca de 0,5m e corresponde a um peso de 2Kg.

BIOLOGIA DA ESPÉCIE

o pregado habita zonas profundas que raramente atingem os 150 metros e prefere fundos arenosos e lodosos. Esta espécie não apresenta dimorfismo sexual. Os sexos são separados e a fecundação e o desenvolvimento embrionário são externos. A maturação sexual é atingida entre os 3 e 4 anos de idade.

A temperatura óptima de desenvolvimento das gónadas é de 15 a 16°C. A época de postura ocorre de Maio a Junho na Bretanha e no início da primavera no Mediterrâneo (PERSON- LE RUYET, 1992). Em Portugal a maturação ocorre entre Abril e Maio.

1.3.1.TÉCNICA DE PRODUÇÃO

O pregado cultiva-se em regime de cultura intensiva. As larvas são obtidas por postura induzida de progenitores com idades superiores a 3 ou 4 anos, cuja origem podem ser selvagem ou de cultura, seleccionados pelo seu crescimento e características.

Os factores que influenciam o cultivo e alimentação dos peixes planos são a salinidade, a temperatura, a intensidade luminosa, a quantidade de oxigénio disponível e a densidade do cultivo, que a seguir se descrevem sumariamente:

A *temperatura* para o crescimento óptimo situa-se entre 17 a 18°C. É superior para os exemplares mais pequenos, sendo da ordem dos 20° C. As temperaturas letais estão próximas dos 2 e dos 28 a 30° C e os limites de crescimento situam-se entre 6 a 8°C e 23 a 25°C conforme o tamanho(BAUTISTA,1991)

Relativamente ao *oxigénio*, o consumo não é muito elevado, variando em função da temperatura e do peso médio. O valor do oxigénio crítico situa-se nos 3ppm e a concentração letal é de 1ppm (PERSON-LE RUET, 1992).

O crescimento cessa para valores de *pH* inferiores a 7, com níveis elevados de CO₂ e quando os valores de NH₃ (amónio não ionizado) alcançam 0,3 mg/ L. A partir destas concentrações, as branquias são afectadas (PERSON-LE RUET, 1992).

Esta espécie é relativamente *eurialina*, com um crescimento óptimo a 20-35‰. A salinidade exerce um efeito letal para valores inferiores a 15‰ (PERSON-LE RUET, 1992).

Em geral, a *densidade do cultivo* (cargas) é de 10 a 15 Kg/m² em animais de 20-25g, 20 a 30 Kg/m² até aos 500g e de 30 a 50 Kg/m² no acabamento. Os juvenis de pregado suportam bem a estabulação em camadas sucessivas (até 3-4 camadas), o que permite elevadas cargas de produção.

A obtenção de pregado com tamanho comercial (1,5 a 2 Kg) é realizada em três anos e compreende as fases seguintes: obtenção de ovos e larvas, produção de juvenis(3 meses), pré - engorda (3 a 6 meses) e engorda (6 meses a 2-3 anos) (PERSON-LE RUYET, 1992).

As necessidade nutricionais do pregado são ainda mal conhecidas. Estudos realizados por CACERES-MATINEZ *et al.* (1984), ANDERSEN &ALSTED (1991), NIJHOF (1993) e DRÉANNO (1994), mostraram que as necessidades em proteínas dos juvenis de pregado são mais elevadas que as de outros peixes. As melhores taxas de crescimento específicas (TCE) são obtidas para concentrações de 65 a 80 % de proteínas no alimento associadas a concentrações máximas de lípidos de 5 a 10%. A digestibilidade das proteínas é cerca de 80% (CACERES-MATINEZ *et al.*, 1984; DRÉANNO, 1994).

1.3.2. ACTIVIDADE FISIOLÓGICA DO PREGADO E EXCREÇÃO DE AZOTO E DE FÓSFORO

A actividade fisiológica do pregado é influenciada por vários factores:

Factores bióticos

- ♦ a espécie;
- ♦ o peso (Por exemplo, a excreção azotada diminui com o crescimento do peixe. Segundo DOSDAT, (1992), 1000 peixes de 1 g excretam mais que um peixe de 1Kg).

Factores ambientais

- ♦ a temperatura da água, que condiciona em conjunto o metabolismo e a quantidade de azoto excretado (FORSBERG & SUMMERFELT, 1992);
- ♦ a concentração de amoníaco na água. Sabe-se que o gradiente de concentração de amoníaco entre o meio exterior e o meio interior, ao nível das brânquias, condiciona a excreção branquial, e que a presença de amoníaco na água leva a uma diminuição, pelos menos temporária, da sua excreção (DOSDAT, 1992);
- ♦ a salinidade (KAKUTA *et al.*, 1992)

Factores zootécnicos

- ♦ densidade da cultura;
- ♦ a alimentação no aspecto quantitativo (quantidade total ingerida, azoto ingerido (SAVITZ *et al.*, 1977), e no aspecto qualitativo (equilíbrio da razão azoto, energia (KAUSHIK, 1991).

O **fluxo de azoto** nos tanques de cultura intensiva está representado de uma forma esquemática na figura 1.5.

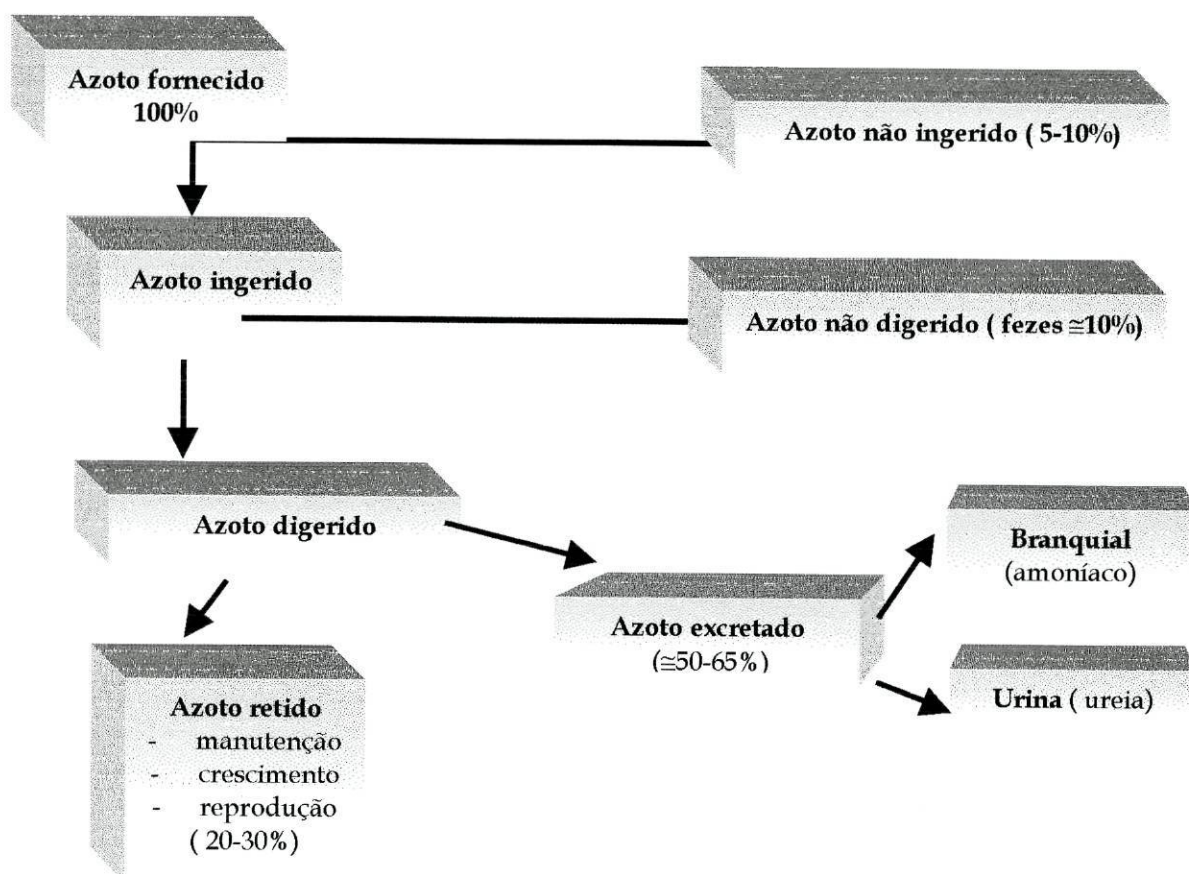


Figura 1.5. - Utilização do azoto distribuído aos peixes (adaptado de DOSDAT, 1992)

Do esquema apresentado pode concluir-se que os peixes não utilizam completamente o azoto colocado à sua disposição. Assim, as perdas azotadas são de três tipos: o azoto não ingerido; o azoto sob a forma de fezes e o azoto metabólico (amónia e ureia).

Vários estudos mostram a existência de um pico de excreção de amónia em vários peixes, nomeadamente no pregado (POXTON & ALLOUSE, 1987; DOSDAT *et al.*, 1995; TÉTU, 1996), cerca de 5 a 8 horas após a refeição . O tempo de aparecimento deste, e a sua amplitude, variam com a espécie, o peso e a temperatura da água. Por exemplo, um aumento da temperatura provoca um aumento significativo na excreção de azoto total (FORSBERG & SUMMERFELT, 1992).

Quando ocorre uma segunda distribuição de alimento, sem a amónia ter voltado ao valor de base, o 2º pico ainda é mais elevado e mais durável do que o primeiro. Consta-se, portanto, que os efeitos de cada refeição se acumulam (KAUSHIK,1980; RAMNARINE *et al.*, 1987 in TÉTU, 1996).

Os valores médios de excreção azotada determinados nos Teleósteos situam-se próximo de algumas centenas de miligramas de azoto total /Kg de peso corporal e por dia (N/Kg /dia), em que cerca de 80% são representados pelo amoníaco e ureia. A avaliação destes dois elementos finais do catabolismo são suficientes para avaliar a excreção de um lote de peixes (DOSDAT *et al.*, 1993).

Relativamente ao fósforo podemos observar como se processa o seu fluxo num tanque de cultura intensiva na representação esquemática da figura 1.6

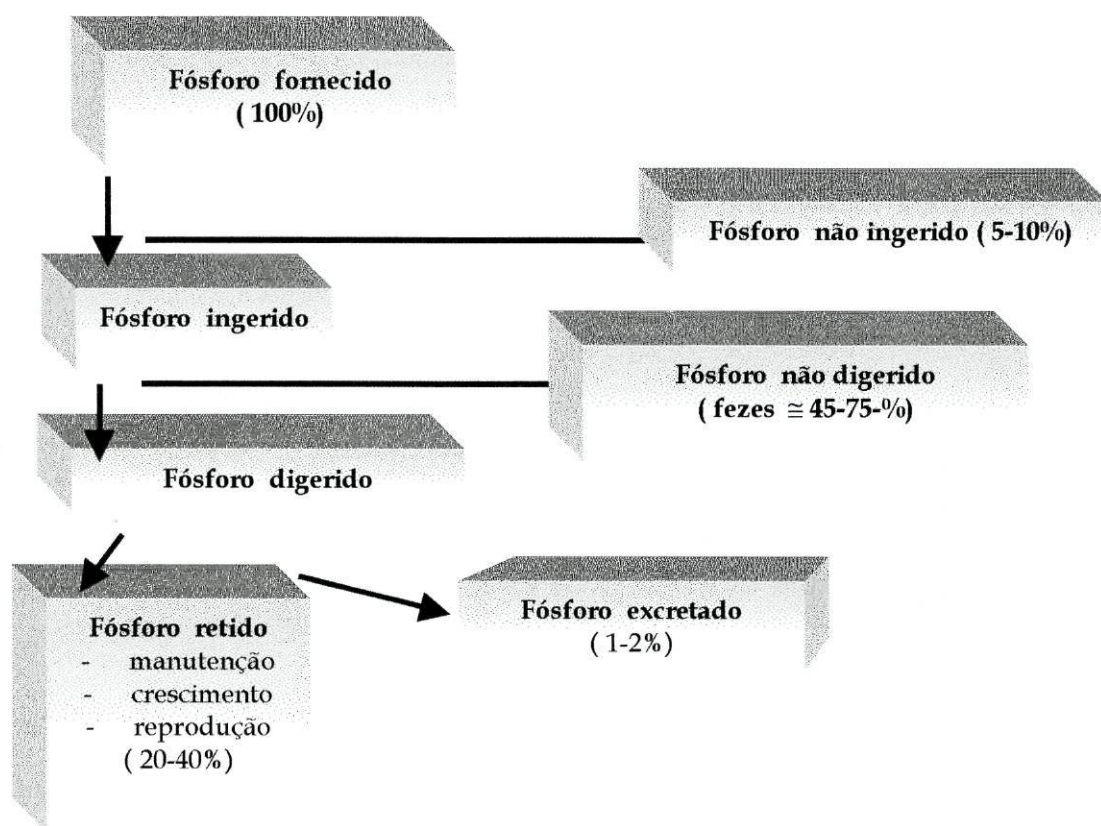


Figura 1.6.- Utilização do fósforo fornecido aos peixes (adaptado de DOSDAT, 1992)

Dos dados da figura pode inferir-se que os peixes não utilizam todo o fósforo fornecido. Além dos 10% não ingeridos, através da fezes são lançados para o meio receptor cerca de 45 a 75% do fósforo fornecido. Do restante somente 20 a 40% são utilizados para a manutenção, crescimento e reprodução do animal.

Verifica-se então, que quer para o azoto quer para o fósforo ocorre uma grande perda de nutrientes para o meio receptor, decorrente de todo o processo fisiológico dos animais.

1.4. Objectivos do trabalho efectuado

Com o trabalho realizado pretendeu-se :

- *Avaliar* a qualidade físico-química do *efluente* de um conjunto de três tanques representativos da produção numa piscicultura intensiva de *Pregado*;
- *Estimar* e *melhorar* a fertilidade potencial do *efluente* analisado para a *cultura* de *microalgas* com interesse comercial;
- *Seleccionar* a *espécie microalgal* com *maior* capacidade de *remoção* de *nutrientes* azotados e fosfatados do efluente piscícola.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi realizada nas instalações da Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre" da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. As colheitas de efluente foram efectuadas numa piscicultura de Pregado no norte do país.

O trabalho desenvolvido constou da caracterização do efluente e das condições de funcionamento da piscicultura, da utilização do efluente como meio de cultura para microalgas em bruto ou após correcção nutricional, e da avaliação da remoção de nutrientes conseguida.

Paralelamente, fez-se a indução de "blooms" de microalgas na água do mar da região da piscicultura estudada, tendo-se isolado uma espécie fitoplanctónica autóctone.

2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PISCICULTURA ESTUDADA

O efluente piscícola utilizado foi proveniente de uma piscicultura marinha situada no norte de Portugal, numa zona de agricultura intensiva, especialmente em estufa, existindo ainda uma extensa zona relvada de lazer muito próxima.

A região em que a piscicultura esta integrada apresenta uma paisagem sob a forma de dunas litorais, é uma zona muito ventosa em que a temperatura do ar varia entre 12,5°C e 15°C; a precipitação é de 75 -100 dias por ano; a insolação é de 2400 - 2500 horas por ano e o pH do solo é ácido (4,6 e 5,5) (Atlas do ambiente, DGA, 2000).

A piscicultura em estudo é uma das unidades do norte do país a dedicar-se à produção do pregado. Todos os dados sobre a piscicultura foram fornecidos, pessoalmente, através do Biólogo responsável pela mesma. Soube-se, assim que não foi efectuado, até à data qualquer estudo sobre as condições exactas de funcionamento da piscicultura, nem qualquer estudo de impacte ambiental. Contudo, o ambiente é uma preocupação dos responsáveis pela mesma. Assim, nesta piscicultura efectuem-se sempre melhoramentos com esse fim e, por exemplo na

fase de redacção deste trabalho tinha sido implementado um novo filtro mecânico, com lavagem automática, um filtro biológico e posteriormente um sistema de tratamento químico da água por ozono.

O tipo de cultura efectuado é intensivo e o circuito hidráulico é essencialmente semi-fechado . A alimentação fornecida aos peixes é constituída por rações produzidas numa unidade industrial portuguesa de produção de alimento para peixe (ALPIS) . A ração apresenta as características aproximadas seguintes: proteínas-60%; óleo de peixe- 14%; humidade - 9%; cinzas- 13%; energia- > 20kJ/g; proteína digerível- > 80%. A proteína tem origem em farinha de peixe de tipo misto, nacional e estrangeira.

Acrescenta-se ainda que esta piscicultura efectua também uma pequena produção integral de Robalo (*Dicentrarchus labrax*).

ESTRUTURA GERAL

As instalações da piscicultura compreendem espaços interiores e exteriores. No interior localizam-se as áreas seguintes: maternidade, instalação de produção de juvenis, zona de engorda, tanques de reserva de água para a maternidade, sala de abate e armazenamento e área social, sala de culturas de microalgas, sala de alimento vivo e laboratório. Existem a bomba de captação de água, depósito elevado de água, filtro mecânico e o filtro biológico, decantador e as bombas de recirculação, no espaço exterior da piscicultura.

A zona de engorda apresenta 72 tanques quadrangulares de cimento (6x6x1m), dispostos em 24 grupos de três tanques cada, colocados em série . O volume de água em cada tanque é 36 m³, sendo o volume total desta zona da piscicultura de 2592 m³ . Quatro desses tanques são usadas como reserva de água para a maternidade.

A unidade de bombagem é constituída por duas bombas de captação de água do mar com a capacidade de 50 L/s e 200 L/s, respectivamente e duas bombas para a recirculação da água, com a capacidade de 120 L/s e 80 L/s cada uma.

A adição de oxigénio aos tanques é contínua (manutenção de O₂ > 4 mg/L).

CAPACIDADE DE PRODUÇÃO

A capacidade de produção na engorda no momento deste estudo (60-70 toneladas) era inferior às capacidades totais da piscicultura (150 toneladas/ ano) .

CICLO PRODUTIVO

A maternidade arranca com juvenis (10-20g de peso fresco) em dois períodos do ano, Março/Abril e Agosto /Setembro . Estes permanecem na unidade de pré- engorda até atingirem os 60 - 80 g de peso fresco. Na zona de engorda permanecem até atingir entre 1- 1,5Kg o que acontece cerca de um ano e meio após o início de cada ciclo produtivo na instalação.

Os animais na engorda são alimentados duas vezes por dia, entre as 9-10horas e entre as 14-15 horas. O alimento é distribuído até à saciedade, 2/3 do total de manhã e o resto à tarde. A ração representa cerca de 1-1,5% da biomassa e estima-se que 10% a 15% do alimento distribuído não é consumido.

CIRCUITO HIDRÁULICO

A água do mar, após captação, é enviada para um depósito elevado, sendo depois distribuída pela piscicultura por gravidade, misturada com água recirculada, em maior ou menor percentagem, dependendo da capacidade da bomba em funcionamento. Esta por sua vez depende do tipo de maré. Uma parte desta água, após decantação em tanques interiores e por filtração (filtros de areia) e esterilização por Ultravioletas (U.U.) é encaminhada para a maternidade entrando posteriormente, de novo, na circulação geral, via depósito elevado, sendo reutilizada nos tanques de engorda.

Na figura 2.1 descreve-se, esquematicamente, o circuito da água na piscicultura .Também se apresentam os locais de colheita das amostras efectuadas neste trabalho indicadas pelas letras A₁, A₂, A₃ e A₄.

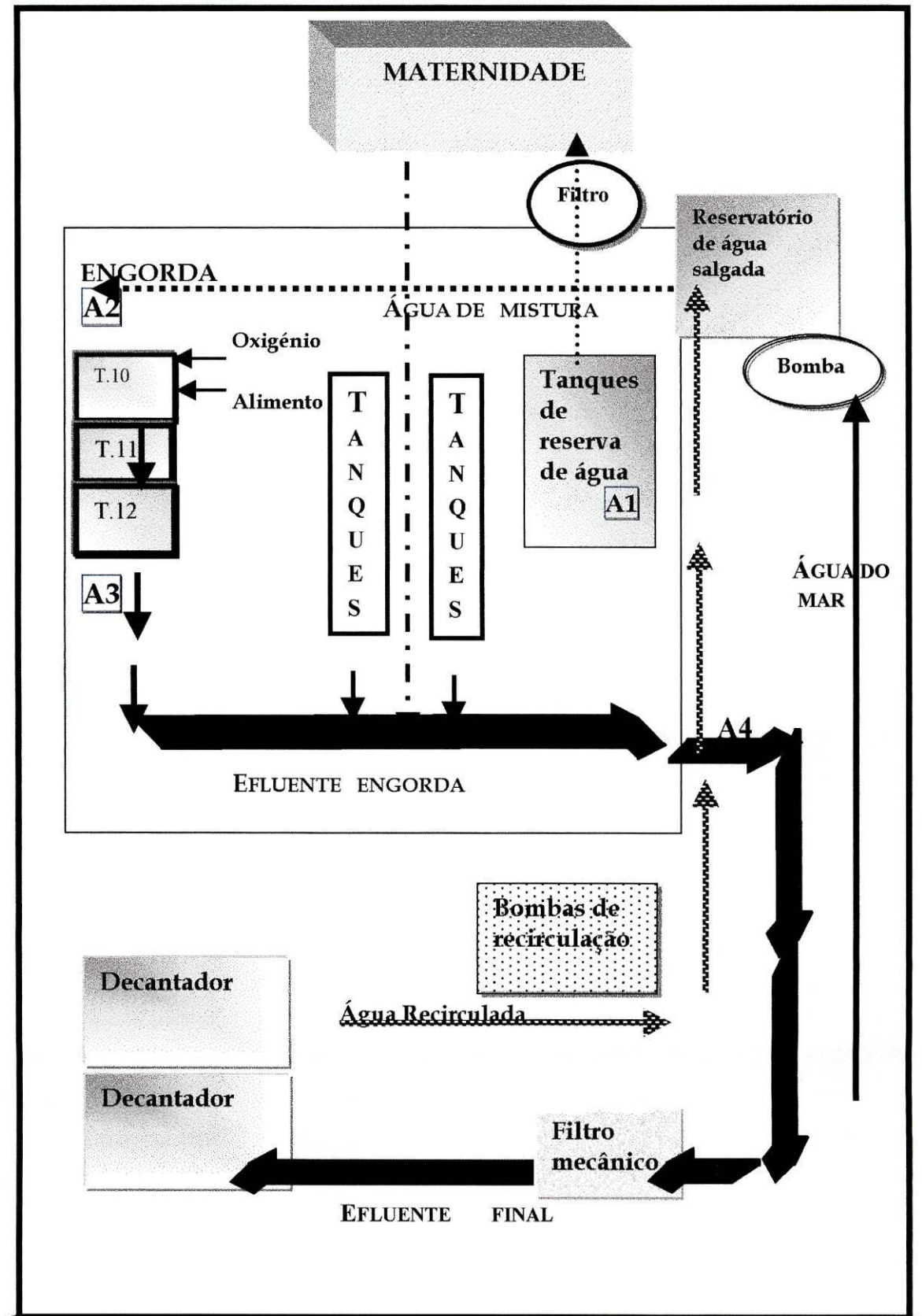


Figura 2.1.- Representação esquemática do circuito da água na piscicultura.

Como se pode constatar, no esquema, a água que é utilizada na zona de engorda é geralmente o resultado da água de mistura de água do mar nova com água recirculada.

O fluxo teórico de água existente em cada tanque, segundo dados fornecidos pela piscicultura, é de sensivelmente, 1L/s, ou seja, no mínimo de uma renovação por hora. Presume-se que, diariamente, pelo menos durante 3 a 6 horas se utiliza só água totalmente recirculada

Uma vez por semana faz-se o esvaziamento e limpeza dos tanques por secção, que se enchem novamente com água do mar nova. Mensalmente é efectuada uma desinfeção com formol

TRATAMENTO DO EFLUENTE

O tratamento efectuado ao efluente da piscicultura, no momento em que se iniciou este estudo, tinha como objectivo principal a remoção de sólidos. Este tratamento, realizado por métodos físicos, consistia na passagem do efluente por um filtro mecânico, seguido do repouso do efluente num decantador, em que o tempo de retenção era muito reduzido.

Durante a quase totalidade do período de estudo constatou-se que o filtro mecânico estava várias vezes sem funcionar por problemas de acumulação de macroalgas e inutilização da tela de revestimento.

A zona da maternidade possui dois filtros de areia exclusivamente para filtrar a água a utilizar nessa zona e ainda uma unidade de Ultravioletas.

De notar que um dos problemas mais prementes da piscicultura é a areia, dado que a unidade não possui qualquer sistema de decantação da água bombeada directamente do mar. Sendo assim, esta sedimenta parcialmente nos depósitos de água, tendendo também a aparecer nos tanques de cultura.

2.2. Locais de amostragem e tratamento das amostras

Para a realização deste trabalho seleccionaram-se inicialmente três locais de amostragem, que foram os seguintes: A₁- água de entrada na piscicultura; "A₂"- efluente total da piscicultura não tratado e "A₃"- efluente total após tratamento primário (passagem por um filtro mecânico).

Dadas as características heterogêneas da piscicultura quanto às espécies cultivadas (pregado e robalo), cargas, regime hidráulico, etc., ficou determinado que a investigação seria limitada a uma série de três tanques pré - seleccionados de cultura de pregado, em que se conheceria o seu funcionamento relativamente ao número de peixes, à biomassa, ao alimento distribuído e à carga por metro cúbico.

Posteriormente, a designação definitiva das amostras é a que se descreve seguidamente:

A₁ - corresponde à água do mar que entra na piscicultura e caracteriza a zona de implantação da piscicultura. Atendendo à estrutura do sistema de captação não foi possível amostrar directamente a água que circulava na tubagem de captação, mas apenas a que entrava nos tanques de reserva para a maternidade.

A₂ - corresponde à água que entra no primeiro tanques do conjunto dos três tanques em estudo e que pode conter percentagens variáveis de água recirculada. Esta amostra permitirá conhecer o regime hidráulico em que se encontrara a piscicultura no momento da amostragem e o modo de funcionamento desta, por exemplo se a maternidade estava activada ou não, na altura da amostragem.

A₃ - corresponde à água que sai do conjunto dos tanques escolhidos e permite avaliar a poluição provocada pela carga estabulada e fazer uma extrapolação acerca do impacte da piscicultura no meio ambiente, ao ser comparada com A₁.

Nas colheitas efectuadas durante os meses de Janeiro e Fevereiro o efluente total (amostra designada por " A₃") foi ainda analisado mas com a designação de amostra A₄.

A amostragem foi realizada mensalmente, de Janeiro de 1999 a Novembro 1999, com excepção dos meses de Julho e Outubro.

No mês de Novembro foram efectuadas duas colheitas, em situações de regime hidráulico diferente, dado que a análise dos dados obtidos até ao momento tinha permitido concluir que o regime hidráulico em que a piscicultura se encontrava no momento da colheita influenciava a composição físico-química do efluente.

Sempre que possível, antes de se efectuar a colheita das amostras, procedia-se à recolha de informações sobre o funcionamento da piscicultura, anotando-se as condições em que esta se encontrava, assim como se fazia o registo da temperatura, oxigénio, carga, peso/médio e número de peixes nos tanques em estudo.

As colheitas foram efectuadas, no período da tarde (16h) na tentativa de se obterem valores de amónia em fase de pico.

As amostras eram colhidas em bidões de plástico com a capacidade de 10L. Seguidamente eram transportadas rapidamente para o laboratório onde se realizava uma primeira filtração com uma rede de plâncton, seguida de uma filtração com filtros do tipo Whatman GF/C.

Procedeu-se, sempre que possível, à análise físico-química imediata das amostras . Quando esta não foi viável as amostras foram congeladas (a -20°C), após a filtração, em recipientes de plástico com 3 L de capacidade.

Amostras não filtradas foram sujeitas a um processo de indução de crescimento microalgal nas amostras designadas por A₁ (água do mar) e A₃ (água do conjunto de

três tanques) na perspectiva de se obterem espécies autóctones para serem utilizadas no tratamento do efluente em estudo.

2.3. Microalgas utilizadas

As microalgas utilizadas neste trabalho foram *Tetraselmis suecica* e *Phaeodactylum tricornutum*, provenientes do IPIMAR, Lisboa, e um flagelado autóctone obtido durante a indução de crescimento a partir da amostra A1.

2.3.1. AS MICROALGAS *Tetraselmis suecica* E *Phaeodactylum tricornutum*

Tetraselmis suecica(Kylin) Butcher, 1959 (= *Platymonas suecica* Kylin, 1933)

Posição Sistemática

Phyllum - PRASINOPHYTA

Classe - PRASINOPHYCEAE,

Ordem - PYRAMIMONADALES

Família - PYRAMIMONADACEAE

Género - *Tetraselmis*

Espécie - *Tetraselmis suecica*

Tetraselmis suecica (figura 2.2.) é uma microalga marinha . As células de *T. suecica* são verdes brilhantes, móveis, ovóides e achatadas lateralmente. Apresentam quatro flagelos polares de igual tamanho. A parede celular é lisa, rígida e de espessura mediana. Têm núcleo central, cloroplasto de cor verde, pirenóide grande bem visível, basal, ovóide e com uma calote de amido incompleta. O tamanho das células é de 4-9 µm de diâmetro por 12-16 µm de comprimento. Esta alga apresenta clorofila a e b (DUNSTAN *et al.*, 1992).

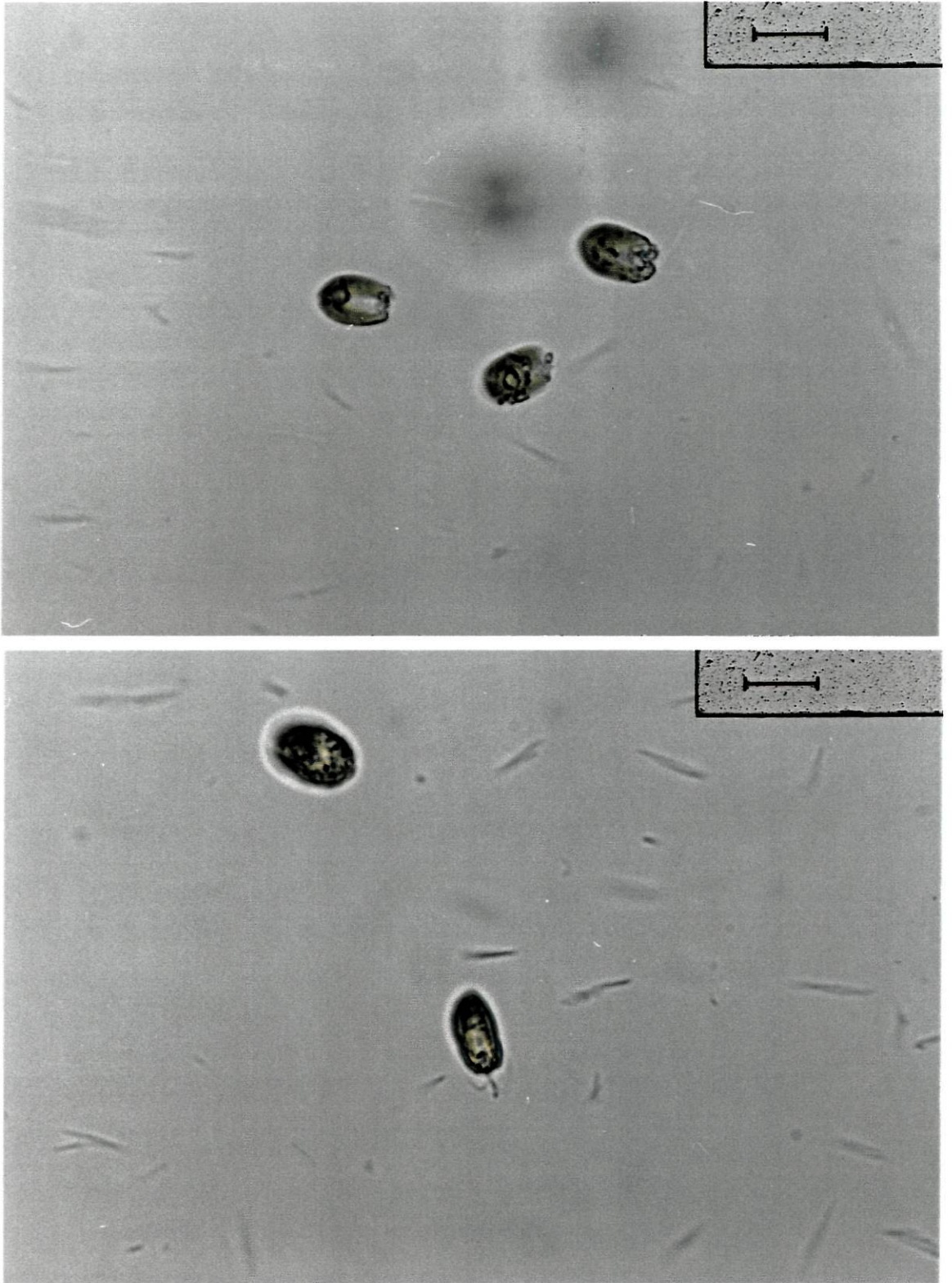


Figura 2.2 *Tetraselmis suecica* (100x) (10 μ)

A reprodução ocorre por divisão longitudinal das células e nessa fase as células perdem a sua mobilidade. Nas culturas podem observa-se restos de tecas e de flagelos (TANOUE & AURUGA, 1975 *in* OTERO 94).

As exigências nutricionais desta alga não são grandes. Assim, pode utilizar amónia, ureia ou nitratos como fonte de azoto embora exista uma preferência por nitratos (OTERO, 1994). *T. suecica* pode ainda ser cultivada em culturas mixotróficas, utilizando carbono orgânico proveniente de açúcares, aminoácidos e extractos de leveduras (HERRERO & FABREGAS, 1985; CID *et al.*, 1992a; 1992b)

A temperatura adequada ao crescimento varia entre 22-26 °C e a salinidade óptima varia entre 25 a 35 ‰, em culturas estáticas (FABREGAS *et al.*, 1984).

Segundo PARSONS *et al.* (1961) a composição química de *Tetraselmis* em percentagem de matéria orgânica total é de : Proteínas - 74 %; Glícidos - 21 % e Lípidos 4 %. Contem ácidos gordos poli - insaturados.

Esta microalga é utilizada como alimento de larvas de moluscos e crustáceos e devido à sua facilidade de cultura é uma das espécies mais utilizadas em aquacultura (LAING & HELM 1981; DE PAW & PERSOONE, 1988).

Phaeodactylum tricornutum, variedade *bicornutum* (Bohlin), 1987

Posição Sistemática

Phyllum - CHRISOPHYTA

Classe - BACILLARIOPHYCEAE,

Ordem - PENNALES

Família - CYMBELLACEAE

Género - *Phaeodactylum*

Espécie - *Phaeodactylum tricornutum*

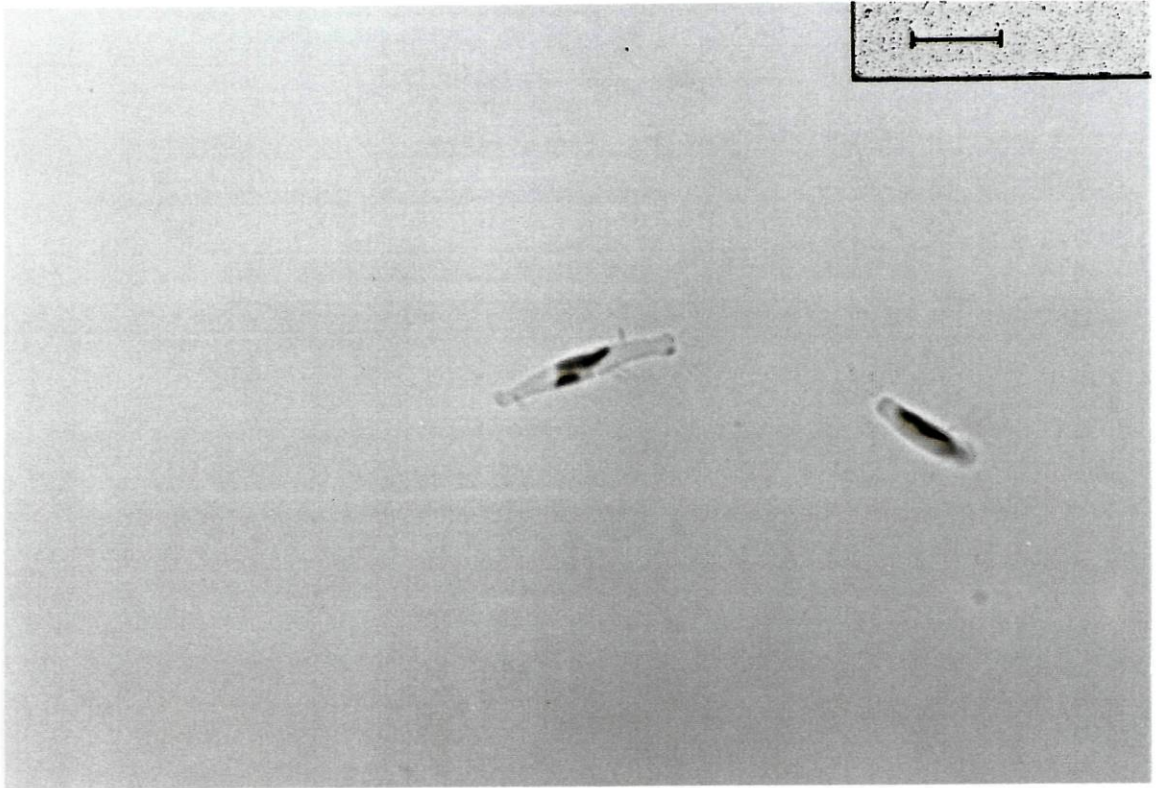


Figura 2.3 - *Phaeodactylum tricornutum*. (Dic 100x)

Phaeodactylum tricornutum é uma microalga marinha. É polimórfica e apresenta duas formas mais comuns, a oval e a fusiforme (GUTTENBRUNNER *et al*, 1994 *in* VEGA 1998), existindo ainda uma terceira, trirradial, menos comum (LEWIN *et al.*, 1958 *in* VEGA1998). A forma fusiforme é a mais usual e carece de parede silícica, enquanto que a forma oval apresenta uma valva silícica por célula. Pode apresentar uma mobilidade moderada e aparece em grumos mucilaginosos. Cada célula contém dois cloroplastos, um núcleo simples dourado e cromatóforos de cor castanha. O tamanho das células é de 3-5 µm de diâmetro por 25-35µ de comprimento (VEGA, 1998).

A temperatura de crescimento varia entre 15-23 °C e a salinidade óptima varia entre 25 a 35 ‰ em culturas estáticas (FABREGAS *et al.*, 1984) .

Esta espécie apresenta clorofila a e c, carotenos, fucoxantina Um dos aspectos mais interessantes desta espécie é a sua produção em ácido eicosapentaenico (EPA), superior à de outras espécies testadas (YONGMANITCHAI & WARD, 1992 *in* VEGA, 1998), além de ser uma espécie com elevada taxa de crescimento e de cultivo fácil, pelo que é utilizada em Aquacultura e no tratamento de águas residuais.

P. tricornutum é uma diatomácea que suporta valores elevados de amónia (MOREAU, 1998).

Todas as células de *P. tricornutum* contém urease, a enzima necessária para decompor a ureia em dióxido de carbono e amoníaco, podendo esta ser metabolizada quando em baixas concentrações.

Segundo PARSONS *et al.*, (1961) a composição química de *Phaeodactylum* é a seguinte, em percentagem de matéria orgânica total : Proteínas- 52 %; Glicídios- 38 %; Lipídios 10%

A espécie utilizada (figura 2.3) apresentava uma forma fusiforme.

2.3.2 INDUÇÃO DE CRESCIMENTO MICROALGAL E ISOLAMENTO DE UMA ESPÉCIE AUTÓCTONE DESIGNADA POR *Flagelado*

Um processo de indução de crescimento microalgal foi efectuado nas amostras designadas por A₁ e A₃ com o objectivo de se obterem espécies autóctones para serem posteriormente utilizadas no tratamento do efluente em questão.

Para a indução prepararam-se a partir das colheitas de Janeiro a Maio, matrizes de 2 L de capacidade, em duplicado, com oxigenação e luz contínua nas condições nutricionais seguintes:

- 1- Amostras de A₁ e A₃ sem enriquecimento de nutrientes, utilizadas como controlo;
- 2- Amostras A₁ e A₃ filtradas por redes de 72 µm, enriquecidas com meio de GUILLARD e RYTHER (1962, *in* GUILLARD (1975) na proporção de 1mL/L.
- 3- Amostras A₁ e A₃ com nutrientes (azoto e fósforo) de acordo com as razões N:P pré - estabelecidas com o objectivo de induzir o crescimento de todo o tipo de algas (excepto diatomáceas);
- 4- Amostras A₁ e A₃ enriquecidas com N,P e Si nas condições anteriores, para induzir também o crescimento de diatomáceas.

Dado não se obterem os resultados esperados, a partir do mês de Abril seguiu-se o mesmo protocolo mas usando o meio de FABREGAS *et al.*, (1984). Consegui-se, então, mediante o método das diluições sucessivas, isolar uma microalga verde, móvel, constituída por células de forma ovalada, com quatro flagelos, que se designou por *Flagelado*. Mais características sobre esta microalga serão apresentadas no capítulo relativos aos resultados.

2.4. Sistema de cultura das microalgas

A metodologia utilizada para a cultura de microalgas, foi a mesma ao longo de todo o trabalho. Para cada espécie procedeu-se a um ensaio preliminar com o objectivo de seleccionar o melhor meio de referência, seguido de um segundo ensaio de

crescimento da mesma no efluente piscícola sem e com correcção de azoto ou de silício no caso de *Phaeodactylum*.

O sistema de cultura utilizado foi o sistema estagnante ou "batch" para todos os ensaios. As microalgas foram cultivadas em matrizes de Erlenmeyer com a capacidade de 2000 mL, num volume útil de 1500 mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

As unidades experimentais foram colocadas numa câmara isotérmica com uma temperatura ambiental de 18 ± 1 °C (EDWART *et al.*, 1981; ABALDE *et al.*, 1991, CID *et al.*, 1992a e 1992b), iluminada com 16 lâmpadas fluorescentes, colocadas lateralmente, 9 das quais eram do tipo Philips-TLD 36W/54 e 7 eram do tipo Silvana Gro-Lux F36W/Gro A intensidade luminosa média foi de 60 $\mu\text{moles/m}^2\text{s}$.

. Atendendo a que havia alguma variação da intensidade luminosa nos diferentes pontos da câmara a localização das unidades experimentais foi alterada de dois em dois dias de modo a tentar minimizar esta fonte de variabilidade nas condições experimentais (MOREIRA, 1996).

As culturas foram expostas a um ritmo circadiano de 12 horas de luz, para 12 horas de obscuridade (ABALDE *et al.* 1991; CID *et al.*, 1992a, 1992b; OTERO, 1994). O sistema de arejamento proporcionava um fluxo de ar contínuo.

A densidade inicial com que se inocularam as culturas foi sempre a mesma para todas as espécies, e da ordem das 2×10^4 células mL^{-1} , encontrando-se as células do inóculo em fase exponencial (CID *et al.*, 1992a, 1992b).

2.5. MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Os meios de cultura ensaiados foram meios sintéticos clássicos e o efluente proveniente do conjunto de três tanques estudados (amostras A3).

2.5.1. MEIOS SINTÉTICOS DE REFERÊNCIA

Os meios de cultura de referência utilizados foram o meio de GUILLARD e RYTHER 1962, GUILLARD 1975 e o meio de FABREGAS *et al.*, (1984). Estes foram preparados segundo as indicações fornecidas pelos seus autores.

No meio de FABREGAS a fonte de azoto são os nitratos e a razão N:P (at:at) é de 20:1. No meio de GUILLARD (meio h/2) a fonte de azoto é a amónia e a razão N:P:Si de 10:1:4.

De notar que a concentração em nitratos do meio de Fabregas é de 28,4 mg/ L (2 mM) e, foi ajustada pelos seus autores para proporcionar uma eficiência de transformação dos nitratos em proteínas da ordem dos 100% (FABREGAS *et al.*,1985).

2.5.2-PROCESSAMENTO DO EFLUENTE PISCÍCOLA

O efluente utilizado para a cultura das microalgas foi a amostra designada por A₃. Este foi filtrado, previamente à sua utilização, por um filtro de fibra de vidro Whatman GF/C, sendo os seus teores em azoto corrigidos sempre que a razão N:P se desviava do valor teórico estabelecido. A correcção em azoto foi efectuada com cloreto de amónia (NH₄Cl) e isto porque o azoto sob a forma de amónia é assimilado pelo fitoplâncton preferencialmente ao azoto sob a forma de nitratos (ROBERT & MAESTRINI, 1986). Por outro lado, a amónia representa a maior fracção do azoto excretado pelos peixes (DOSDAT, 1992).

Nas culturas com a Diatomácea foi adicionado ao meio Na₂ SiO₃ 9.H₂O com uma concentração final de 106 µM (GUILLARD, 1972).

2.6. Análises efectuadas

Foram efectuadas diversas análises às amostras provenientes da piscicultura e ao meio de cultura das microalgas.

2.6.1. ANÁLISES NAS AMOSTRAS DA PISCICULTURA

As amostras foram analisadas, sempre que possível após a visita à piscicultura ou após congelação segundo o processo descrito anteriormente. No processo de descongelação os frascos de plástico foram colocados em água fria, até que a temperatura da amostra fosse superior a 15°C (AMINOT & CHAUSSEPIED 1983).

Dada a especificidade dos efluentes piscícolas, os métodos químicos utilizados rotineiramente para água salgada tiveram de ser reajustados e foi necessário proceder à elaboração de curvas de calibração adequadas, nomeadamente para a determinação da concentração de amónia, fosfatos e silicatos. Estas foram elaboradas segundo as indicações de AMINOT & CHAUSSEPIED, (1983).

Na caracterização físico-química das amostras da piscicultura avaliaram-se os parâmetros seguintes:

- Amónia, segundo o método de KOROLEF, 1983 modificado para a água salgada (AMINOT & CHAUSSEPIED, 1983);
- Nitratos, reacção de GRIESS aplicada à água do mar por BENDSCHNEIDER & ROBINSON, 1952), segundo (AMINOT & CHAUSSEPIED, 1983);
- Nitritos (STRICKLAND & PARSONS, 1972);
- Fosfatos, segundo o método descrito em AMINOT & CHAUSSEPIED, (1983);
- Silicatos segundo (STRICKLAND & PARSONS, 1972)
- Sólidos suspensos totais e voláteis (STRICKLAND & PARSONS, 1972);
- Pigmentos clorofilinos(cl a e feopigmentos) (STRICKLAND & PARSONS, 1972)

Os valores encontrados nos doseamentos de azoto e fósforo foram utilizados para calcular a relação N:P, sendo o azoto (N) considerado como o somatório dos átomos de azoto sob as formas de amónia, nitritos e nitratos (GOLDMAN *et al.*, 1974; GOLDMAN, 1976)

Estes parâmetros foram determinados em todas as colheitas efectuadas para as amostras A₁, A₂ e A₃.

2.6.2- ANÁLISES NAS CULTURAS DAS MICROALGAS

O tempo de duração das culturas foi de oito dias. De dois em dois dias era retirada, assepticamente, uma amostra de cada unidade experimental, avaliando-se os parâmetros seguintes: densidade celular, densidade óptica, biovolume, salinidade e pH.

A **densidade celular** foi avaliada em cada amostra através de seis contagens efectuadas ao microscópio óptico (LEITZ), usando um hemocitómetro NEUBAUER Improved Bright-Line (GUILLARD, 1979). Foram efectuadas diluições em água salgada quando havia um número de células superior a 100 por câmara. As células eram previamente fixadas com lugol a 0,5%.

A **velocidade de crescimento** (μ) foi calculada em dias alternados com base na fórmula seguinte:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_i}{t - t_i}$$

t_i - tempo inicial em dias

t_n - tempo final em dias

N_i e N_n densidades celulares inicial e final respectivamente (GUILLARD, 1979).

O número de duplicações por dia foi calculado segundo STEIN, (1973) pela expressão seguinte:

$$\text{Duplicações/dia} = \mu / 0,6931$$

Segundo FERNANDEZ - REIRIZ *et al.*, (1989) a fase exponencial é caracterizada por apresentar valores de duplicações /dia superiores a 0,1; a fase estacionária inicial por apresentar valores de 0,1 ou inferiores, enquanto que a fase estacionária final deverá apresentar valores nulos ou negativos.

A **densidade óptica** foi medida num espectrofotómetro BAUSH & LOMB Spectronic 100 a um comprimento de onda de 678 nm (BORGES & GILMAN, 1991) utilizando-se água salgada como branco. Sempre que o valor 1 de absorvância era ultrapassado

foram efectuadas diluições com água salgada. As medições foram efectuadas em triplicado por amostra.

O pH foi determinado com uma caneta medidora de pH (pH tester by OAKLON).

A **salinidade** foi medida num refractómetro YSI Instruments, e ajustada com água destilada autoclavada, de dois em dois dias para valores compreendidos entre 30 e 35‰.

Os **volumes celulares** de *P. tricornutum*, *T. suecica* e *Flagelado*, foram medidos comparando a forma das células destas espécies a dois cones unidos pela base, para *P. tricornutum* e a uma elipse para *T.suecica* e *Flagelado*. Para a sua determinação utilizou-se um micrómetro ocular, após avaliação do coeficiente micrométrico, com uma precisão de 0,01 mm. Este parâmetro foi determinado em todos os ensaios.

No final de cada ensaio determinou-se:

- teor em pigmentos (clorofila e feopigmentos);
- teor em sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV);

Após a remoção das microalgas por filtração com filtro de fibra de vidro Whatman GF/C, determinaram-se os parâmetros seguintes no meio de cultura:

- Concentração de fósforo sob a forma de fosfatos;
- Concentração de azoto sob a forma de amónia; nitratos; nitritos;
- Concentração de silicatos, no caso da diatomácea.

Estas determinações foram efectuadas segundo os métodos já referidos para as amostras da piscicultura .

A **biomassa seca** foi avaliada através da filtração de um volume pré- determinado de microalgas por um filtro de fibra de vidro Whatman GF/C, previamente calcinado e pesado filtrando-se de seguida uma solução de formiato de amónio a 0,9% (BORGES

1983). Seguidamente, procedeu-se a uma secagem na estufa a 100°C até peso constante . O teor em cinzas foi obtido por posterior incineração em mufla a 400°C durante 2 h.

2.7. Tratamento dos resultados obtidos

2.7.1. NA PISCICULTURA

DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE NUTRIENTES PRODUZIDA

Para se efectuar uma previsão da produção de nutrientes na piscicultura em estudo calcularam-se os valores seguintes:

- Produção de nutrientes pelo conjunto de tanques estudados, através da diferença entre os valores encontrados para A3 e A2;
- Produção de nutrientes desde a entrada da água na piscicultura até à saída dos três tanques, através da diferença entre os valores obtidos para A3 e A1.
- Calculo da carga de nutrientes em Kg/dia através da expressão seguinte:

$$(A3 - A2) * \text{Fluxo de água}$$

PRODUÇÃO DE SST E SSV NO CONJUNTO DE TRÊS TANQUES SELECCIONADOS

A produção de sólidos nos tanques foi obtida pela diferença entre os valores obtidos em A3 e em A2.

2.7.2. NA CULTURA DE MICROALGAS

RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS

Efectuaram-se análises de regressão linear nas situações seguintes:

Densidade óptica e densidade celular;

2.8.Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi efectuado com o programa Statistica, versão 4.5 para Windows.

Procedeu-se a uma ANOVA seguida do teste TuKey para $p < 0,05$, para os parâmetros amónia, nitratos e fosfatos das amostras da piscicultura e para a densidade óptica e densidade celular obtida nas culturas de microalgas.

3. RESULTADOS

No capítulo dos resultados, por uma questão de ordem prática, apresentam-se primeiro os resultados dos ensaios preliminares, efectuadas seguidos da caracterização da piscicultura, na qual se integra: as análises físico-químicas efectuadas no efluente e a indução de crescimento microalgal. Por fim apresentam-se os ensaios efectuados com as microalgas .

3.1.Ensaio preliminares

Nos ensaios preliminares apresentam-se os resultados das primeiras análises efectuadas à piscicultura e as análises realizadas à água do mar, bem como os resultados obtidos nas curvas de calibração.

3.1.1. RESULTADOS DAS ANÁLISES PRELIMINARES

A tabela 3.1. apresenta os resultados dos parâmetros determinados na piscicultura

Tabela 3.1. Temperatura (°C); pH (escala de Sorensen); Salinidade (‰); Média das concentrações e respectivos desvios padrão (n=3) dos nutrientes (mg/L) obtidos na amostra no ensaio preliminar: nitritos (N-NO₂) ; nitratos (N-NO₃) amónia (N-NH₄⁺); fosfatos (P-PO₄).

Amostras /Parâmetros	T°C	pH	S ‰	N-NO ₂	N-NO ₃	N-NH ₄ ⁺	P-PO ₄
A1	15,0	7,2	30	0,08± 0,00	0,08± 0,00	0,05± 0,00	0,16± 0,012
"A2"	15,0	6,9	30	0,13± 0,00	0,42± 0,00	0,97± 0,27	0,42± 0,00
"A3"	15,0	7,0	31	0,11± 0,11	0,41± 0,00	0,77± 0,34	0,31± 0,00

Os resultados obtidos nestes ensaios indicam-nos que se verifica um aumento de todos os nutrientes, na água de saída da piscicultura amostra ("A2"), relativamente à água de entrada (A1).

A comparação dos valores obtidos em " A2" com "A3", revela que ocorre uma ligeira diminuição no valor de cada nutriente determinado devido à passagem pelo filtro mecânico. Esta acção é mais evidente para a amónia.

3.1.2. EFLUENTE TOTAL DA PISCICULTURA EM JANEIRO E FEVEREIRO (amostra A4)

Na tabela 3.2 apresentam-se os resultados obtidos para os parâmetros avaliados relativos à amostra do efluente total da piscicultura.

Tabela-3.2 Temperatura (°C); pH (escala de Sorensen); Salinidade (‰); Média das concentrações e respectivos desvios padrão (n=3) dos nutrientes (mg/L) obtidos na amostra no período de amostragens considerado: Sólidos suspensos totais (SST) nitritos (N-NO₂); nitratos (N-NO₃) amónia (N-NH₄⁺); fosfatos (P-PO₄); e proporção N:P (átomo : átomo).

Meses /Parâmetros	T°C	pH	S%	SST	N-NO ₂	N-NO ₃	N-NH ₄ ⁺	P-PO ₄	N:P
Janeiro	13,0	6,4	32	4,80± 0,00	0,19± 0,00	0,90± 0,00	1,53± 0,004	0,20± 0,00	13:1
Fevereiro	14,3	7,2	34	6,80± 0,00	0,15± 0,00	0,70± 0,00	1,20± 0,00	0,45± 0,00	5:1

Os valores do efluente total são superiores aos obtidos na análise preliminar. Esta diferença de valores poderá ter sido resultado do estado em que se encontrava a maternidade no momento da amostragem da análise preliminar.

3.1.3. OUTROS DADOS

Procedeu-se à análise da água do mar utilizada na Estação de Zoologia Marítima, sempre que esta era necessária, relativamente aos parâmetros seguintes: salinidade (‰); pH; nitritos (N-NO₂); nitratos (N-NO₃) amónia (N-NH₄⁺) e fosfatos (P-PO₄).

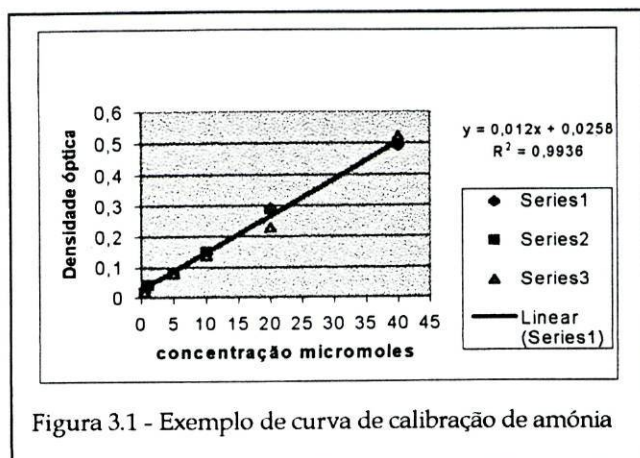
Verificou-se que a salinidade variou entre 32 e 35‰; o pH entre 6,7 e 7,2; os nitratos (N-NO₃) entre 0,21 ± 0,01 e 0,23 ± 0,02 mg/L; os nitritos (N-NO₂) entre 0,00 e 0,04 ± 0,01 mg/L; a amónia (N-NH₄) entre 0,01±0,00 e 0,02±0,00 mg/L e os fosfatos (P-PO₄) variaram entre 0,04 ± 0,01 e 0,05±0,00 mg/L.

3.1.4. CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Foram efectuadas curvas de calibração para os parâmetros amónia, fosfatos e silicatos, adaptadas aos valores de salinidade e às concentrações de nutrientes passíveis de serem observadas em efluentes piscícolas. Apresenta-se seguidamente um exemplo para cada situação.

Amónia

Para as curvas de calibração da amónia foram utilizadas as concentrações seguintes: 0,5-1-2,5-5-10-20-40 $\mu\text{moles/L}$ (AMINOT & CHAUSSEPIED, 1983). Para cada ponto foram efectuadas três réplicas. Um dos resultados obtidos está representado na figura 3.1, sendo o valor de R^2 de 0,9935 e $Y=0,012X+0,0253$ a equação da recta obtida

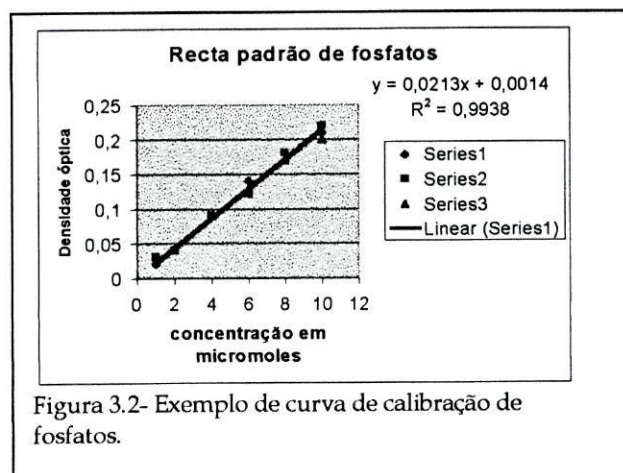


Fosfatos

Para a elaboração das curvas de fosfatos foram utilizadas as concentrações seguintes: 1-2-4-6-8-10 $\mu\text{moles/L}$ (AMINOT & CHAUSSEPIED, 1983).

Para cada ponto foram efectuadas três réplicas. O valor de R^2 obtido foi de 0,9938 e a equação da recta obtida

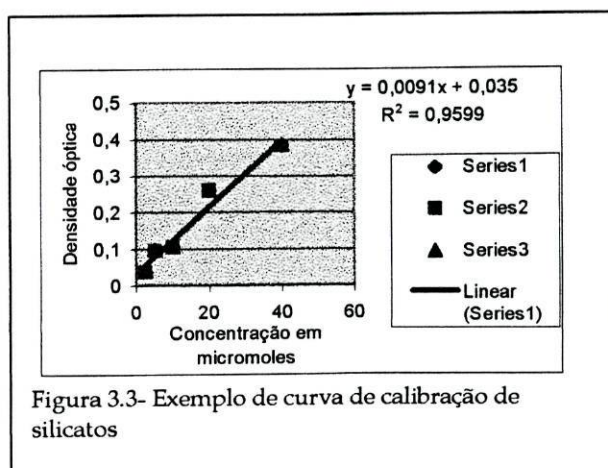
valor de $Y=0,0213X+0,0014$, para o caso observado na figura 3.2.



Silicatos

Para as curvas de silicatos foram utilizadas as concentrações seguintes 2,5-5-10-20-40 $\mu\text{moles/L}$ (AMINOT, 1983).

Para cada ponto foram efectuadas três réplicas. No caso da figura 3.3 R^2 tem um valor de 0,9599, e $Y=0,0091X+0,035$, é a equação obtida para a recta.



3.2. Caracterização da piscicultura

Ao longo de todo o período de estudo as condições existentes na piscicultura não foram constantes por vários motivos sendo os mais importantes o funcionamento ou paragem da maternidade, o tipo de regime hidráulico verificado no momento das colheitas, assim como as alterações estruturais que foram sendo introduzidas no sistema de captação da água do mar.

Atendendo a que a água utilizada na maternidade e "nursery" (cerca 25% do volume total da piscicultura) é depois reutilizada na engorda, é importante referir que durante todo o período de estudo a maternidade esteve a funcionar, com excepção do mês de Fevereiro.

A temperatura média da água na piscicultura variou entre os 12-17°C. Nos meses mais quentes atingiram-se os 21°C e nos meses mais frios, os 9°C. A salinidade variou entre 34 e 37 ‰, e o pH entre 7,3 e 8,0.

3.2.1. REGIME HIDRÁULICO

O regime hidráulico da piscicultura é dependente das marés e a bombagem da água directamente do mar só é possível muitas vezes, durante, aproximadamente, 6 a 8 horas, por ciclo de maré. Daí que, para se manter constante o débito de entrada nos tanques de cultura haja necessidade de recircular a água usada. Assim, consideram-se três situações quanto ao tipo de regime hidráulico observável na piscicultura:

1- captação com a bomba de capacidade de 200L/s, em que a taxa de mistura com a água recirculada é muito baixa, inferior a 10%. Regime próximo de um circuito aberto.

2- captação com a bomba de capacidade de 50L/s, em que a taxa de mistura com água recirculada é de 50%. Regime próximo de um circuito semi - fechado.

3- ausência de captação e recirculação total da água. Operação em circuito fechado.

Uma caracterização mais precisa destes regimes carece de dados físico-químicos, e será debatida mais à frente neste trabalho.

3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS TANQUES EM ESTUDO

Nos tanques seleccionados para o trabalho desenvolvido (tanques 10,11 e 12), registaram-se mensalmente os valores correspondentes a : temperatura, oxigénio, número de peixes, biomassa (kg); peso fresco médio(kg), carga (kg/m³) e alimento distribuído, que se passam a apresentar:

TEMPERATURA E OXIGÉNIO

Na figura 3.4 pode observar-se a evolução dos parâmetros, temperatura e oxigénio ao longo do período considerado, no conjunto dos três tanques em estudo.

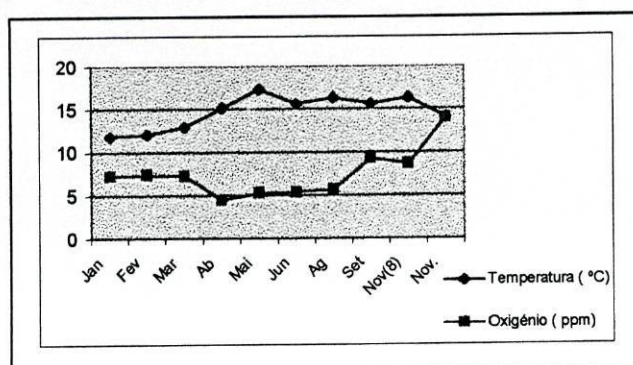


Figura.3.4. Evolução dos parâmetros temperatura e oxigénio nos tanques em estudo.

Constata-se que os valores da temperatura foram variando ao longo do ano, de acordo com as estações, salientando-se o pico observado no mês de Maio em que o valor determinado foi muito elevado (17,3°C). Este mês foi anormalmente quente durante o ano em que o estudo foi realizado.

O oxigénio sofreu algumas variações ao longo do período de amostragem, verificando-se uma diminuição nos meses mais quentes.

A partir do mês de Novembro a mistura do oxigénio com a água de alimentação aos tanques, passou a ser efectuada directamente no depósito da água elevado e com difusores, o que levou ao aumento observado na figura.

NÚMERO DE PEIXES, BIOMASSA, PESO MÉDIO , CARGAS E ALIMENTO

Relativamente ao conjunto de três tanques em estudo o número de peixes foi variando por calibração, como consequência do crescimento dos mesmos. Sendo assim, o número inicial de peixes, que era de 2000 em cada tanque, variou entre 980 e 1100 peixes por tanque no final do período de amostragem. O peso médio dos peixes variou entre 0,320 kg no início do estudo (em Janeiro de 1999) e 0,820 kg em Novembro de 1999. Os valores que se apresentam na tabela 3.3 e nas figuras 3.5 e 3.6 correspondem ao total mensal obtido no conjunto dos três tanques amostrados. Na tabela 3.3 apresenta-se as características relativamente à biomassa , ao peso médio, à carga e à quantidade de alimento distribuído.

Tabela 3.3 - Caracterização mensal dos tanques em estudo relativamente à biomassa (Kg), peso médio (Kg), à carga (Kg/m³) e ao alimento distribuído (1,5% da biomassa).

Meses	Biomassa (Kg)	Peso médio(kg)	Carga (Kg/m ³)	Alimento (Kg)
Janeiro	1898,00	0,32	52,72	28,47
Fevereiro	1829,58	0,35	50,82	27,44
Março	2176,00	0,42	60,50	32,64
Abril	3032,00	0,60	84,22	45,48
Maio	2470,00	0,60	68,78	37,05
Junho	3034,00	0,82	84,27	45,51
Agosto	2882,00	0,48	62,80	43,23
Setembro	2215,00	0,73	61,53	33,23
Novembro	2540,00	0,73	70,55	38,10
Novembro	2407,00	0,80	66,86	36,11

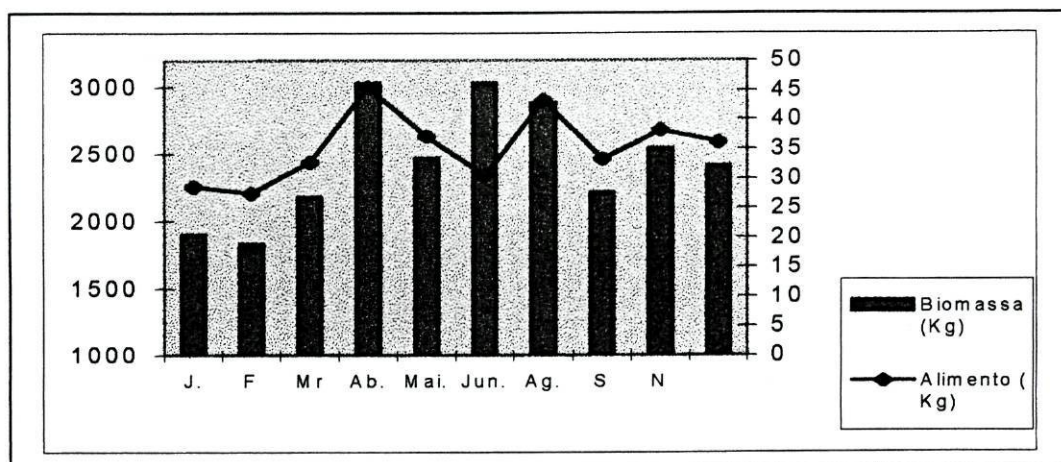


Figura 3.5. Variação mensal da biomassa e do alimento fornecido nos tanques em estudo.

Na figura 3.5 podemos observar que a biomassa existente nos tanques sofreu alterações mensais, sendo os valores mais elevados registados nos meses de Abril,

Junho e Agosto. Tendo em conta que o alimento distribuído depende da biomassa existente, este acompanhou as variações verificadas nesta, à excepção do mês de Junho, provavelmente devido a problemas com o abastecimento de água na piscicultura, o que levou a uma diminuição do alimento distribuído.

A variação das cargas em cada tanque é colocada em evidência na figura 3.6, sendo esta resultante da calibração da biomassa existentes nos tanques. Os valores mais elevados correspondem aos meses de Abril, Junho e Agosto.

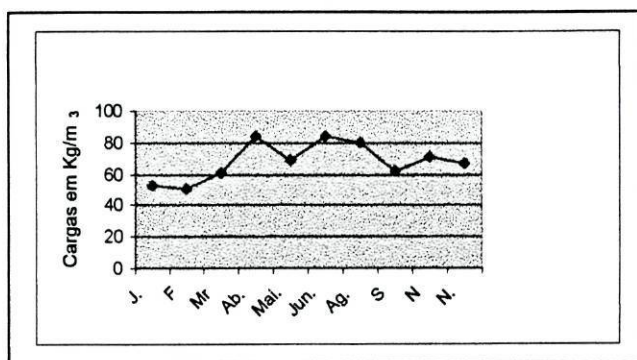


Figura 3.6 Variação mensal das cargas (Kg/m³) nos tanques em estudo durante o período de amostragem.

FLUXO DE ÁGUA

O fluxo de entrada de água nova na série de três tanques em estudo, na primeira amostragem de Novembro, era:

- 1º tanque -1,25 L/s ;
- 2º tanque- 1 L/s mais 1,87 L/s de água nova com oxigénio ;
- 3º tanque - soma dos dois tanques anteriores, mais 1,60 L/s de água nova com oxigénio.

Como o volume de cada tanque é de 36 m³, e os tanques funcionam em série, a taxa de renovação da água em cada tanque é de :

1º tanque-1,25L/s ou 3 renovações por dia;

2º tanque- 3,12 L/s ou 7,5 renovações por dia;

3º tanque- 4,72 L/s ou 11,3 renovações por dia.

SALINIDADE E pH

Como já foi referido anteriormente, os valores de salinidade e pH nos tanques estudados variaram entre 34 e 37‰ e entre 7,3 e 8,0, respectivamente.

3.2. 3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO- QUÍMICA DAS AMOSTRAS DA PISCICULTURA

ÁGUA DE ENTRADA NA PISCICULTURA (A₁)

A caracterização da água que é utilizada pela piscicultura foi efectuada através da determinação de diversos parâmetros físico-químicos que são apresentados seguidamente. A representação gráfica do valor dos sólidos suspensos obtidos nas três amostras é apresentada em último lugar.

A tabela 3.4 estão patentes os resultados obtidos na amostragem realizada à água que entra na piscicultura, proveniente do depósito elevado, amostra designada por A₁.

Tabela 3.4. Média das concentrações e respectivos desvios padrão¹ (n=3) dos nutrientes (mg/L) obtidos na amostra A₁ no período de amostragens considerado: Sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV). nitritos (N-NO₂) ; nitratos (N-NO₃) amónia (N-NH₄⁺); fosfatos (P-PO₄);

- 1- No mês de Abril os resultados correspondentes aos nitratos resultam da média dos valores obtidos para outros meses, devido à perda da amostra
- 2- Novembro 2- não existem resultados por impossibilidade de colheita no momento de amostragem.

Meses/ Parâmetros	SST	SSV	N-NO ₂	N-NO ₃	P-PO ₄	N-NH ₄ ⁺
Janeiro	64,01± 0,00	Nd.	0,02 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Fevereiro	68,05± 0,00	28,12± 5,65	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Março	50,12± 25,45	4,21± 0,00	0,02 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,07 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Abril	142,02± 8,49	18,12± 0,28	0,02 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,12 ± 0,00
Maio	54,12± 19,70	10,05± 2,28	0,01± 0,00	0,17 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,13 ± 0,00
Junho	98,21± 2,55	16,21± 0,00	0,20 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,51 ± 0,01	1,71 ± 0,01
Agosto	310,03± 7,77	75,07± 2,57	0,02 ± 0,00	0,22 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,16 ± 0,01
Setembro	92,21± 5,66	16,31± 0,00	0,02 ± 0,00	0,19± 0,01	0,05 ± 0,00	0,14 ± 0,00
Novembro1	24,32± 0,00	6,30± 2,82	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00

De um maneira geral, constatamos que a água utilizada pela piscicultura apresenta valores relativamente elevados para os nitratos, com um valor mínimo de 0,17 mg/L em Maio e um valor máximo em Janeiro (0,24 mg/L).

Quanto aos nitritos, o valor mínimo detectado, 0,01 mg/L, ocorreu nos meses de Fevereiro, Maio e Novembro, sendo nos meses restantes de 0,02mg/L .

Quanto aos valores de fosfatos, o mínimo foi observado nos meses de Janeiro, Maio e Agosto (0,04 mg/L) e o valor máximo em Abril (0,17 mg/L).

Finalmente para os valores de amónia o mínimo foi observado em Março (0,01mg/L), e o máximo foi 0,16 mg/L, em Agosto.

A representação gráfica da variação mensal da percentagem de nutrientes (amónia, nitratos, nitritos e fosfatos) analisados na água de abastecimento da piscicultura está representada na figura 3.7

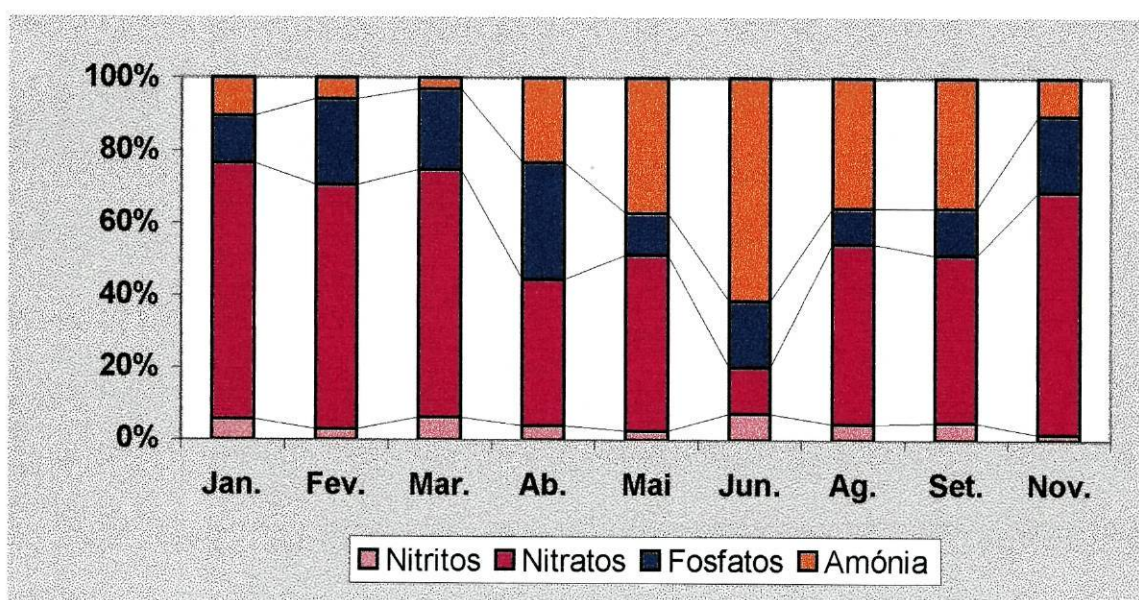


Figura 3.7. Percentagem de nutrientes observada na água de entrada da piscicultura.

Na figura constata-se que os nitratos são, na generalidade, os nutrientes que predominam na água que abastece a piscicultura.

Na análise efectuada não se fez referência aos valores obtidos em Junho, pois como iremos ver, o regime hidráulico em que a piscicultura se encontrava no momento da colheita era diferente de qualquer um dos outros meses considerado.

A análise estatística efectuada (ANOVA, com $p < 0,05$) para o parâmetro concentração de amónia, revelou que os meses de Janeiro, Fevereiro, Março e Novembro não apresentavam diferenças significativas entre si. O mesmo se observou

para os meses de Abril, Maio e Setembro, no entanto estes diferiam significativamente dos meses anteriormente referidos. O mês de Junho apresentou diferenças significativas relativamente a todos os outros meses ($p = 0,0002$).

Para a concentração de nitratos, a ANOVA efectuada ($p < 0,05$) revelou que os meses de Janeiro, Fevereiro, Março, Abril e Agosto não apresentavam diferenças significativas entre si. Já o mês de Janeiro diferia significativamente dos meses de Maio, Junho, Setembro e Novembro ($p = 0,0001$). Novamente o mês de Junho apresentou diferenças significativas relativamente a todos os outros meses ($p = 0,0001$).

Quanto aos fosfatos, a análise estatística (ANOVA, $p < 0,05$) permitiu formar os seguintes grupos de meses semelhantes entre si: Janeiro, Maio, Junho e Agosto ; Fevereiro e Março ; Setembro e Novembro.

O mês de Abril mostrou-se significativamente diferente de todos os outros meses ($p = 0,0002$).

Conforme referido anteriormente, a piscicultura apresenta uma hidráulica complexa, resultante do regime de marés, razão pela qual a água que abastece a piscicultura pode não ser só água do mar, mas sim água resultante da mistura desta com água recirculada, em maior ou menor percentagem, no reservatório. Com o objectivo de se esclarecer melhor o funcionamento da piscicultura estudada e face aos dados por nós obtidos durante a caracterização físico-química das amostras, foi efectuada uma avaliação do regime hidráulico, mais provável, em que se encontrava a piscicultura nos dias em que a colheita de amostras foi efectuada.

Para a elaboração desta caracterização, consideramos como referência a composição da água do mar segundo AMINOT & CHAUSSEPIED, (1983) que é a seguinte:

- em águas costeiras não poluídas e em meio oceânico, as concentrações de amónia são geralmente inferiores a $0,014 \text{ mg/L}$; os nitritos podem variar entre $0,007$ e $0,014 \text{ mg/L}$ no Inverno e $0,0014 \text{ mg/L}$ no Verão; os nitratos podem variar entre $0,14$ e $0,21 \text{ mg/L}$; o teor em fosfatos é geralmente

baixo em meio oceânico e costeiro não poluído, podendo variar entre 0 e 0,031mg/L.

Ao comparar os valores indicados pelo autor citado com os valores obtidos, consideramos que os resultados em A1 no mês de Fevereiro (Amónia 0,0 2mg/L; nitratos-0,20 mg/L; nitritos 0,01 mg/L e fosfatos 0,07 mg/L) são os mais próximos dos de uma água do mar. Assim, na colheita do mês de Fevereiro, a percentagem de mistura de água nova e água recirculada deveria ter sido muito baixa, pelo que a piscicultura estaria a funcionar em regime praticamente aberto.

Tendo em conta estes dados, consideramos que no momento em que foram efectuadas as colheitas, o regime mais provável em que se encontrava a piscicultura é o que se apresenta na tabela 3.5

Tabela 3.5 Regime hidráulico mais provável da piscicultura no momento das colheitas.

Meses	Caracterização da piscicultura
Janeiro	Semi - fechado
Fevereiro	Aberto
Março	Semi - fechado
Abril	Semi - fechado
Maio	Semi - fechado
Junho	Fechado
Agosto	Semi - fechado
Setembro	Semi - fechado
Novembro ₁	Semi - fechado

Como já foi referido anteriormente, a colheita efectuada no mês de Junho foi realizada no período durante o qual a piscicultura se encontrava em regime fechado, isto é sem aporte de água do exterior. Toda a água que circulava na piscicultura era água recirculada. Nos restantes meses as colheitas foram efectuadas em regime semi -fechado, com maior ou menor percentagem de mistura de água.

ÁGUA DE ENTRADA NO CONJUNTO DE TRÊS TANQUES (A₂)

A água que entra nos tanques de engorda é sempre água recirculada. A sua composição depende do funcionamento da maternidade e pré - engorda, e do circuito hidráulico da piscicultura. Os dados relativos a esta amostra estão representados na tabela 3.6 e na figuras 3.8.

Tabela 3.6 Média das concentrações e respectivo desvios padrão (n=3) dos nutrientes (mg/L) obtidos na amostra A₂ no período de amostragens considerado: Sólidos suspensos totais (SST) e Sólidos suspensos voláteis (SSV).Nitritos (N-NO₂) ; Nitratos (N-NO₃) Amónia (N-NH₄⁺); Fosfatos (P-PO₄).

Meses/ Parâmetros	SST	SSV	N-NO ₂	N-NO ₃	P-PO ₄	N-NH ₄ ⁺
Janeiro	6,40 ± 0,00	n.d	0,19 ± 0,00	0,39 ± 0,00	0,26 ± 0,01	0,76 ± 0,01
Fevereiro	56,21 ± 5,65	12,01 ± 5,65	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,02
Março	12,21 ± 0,00	2,05 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,45 ± 0,03	0,84 ± 0,01
Abril	90,22 ± 2,28	18,12 ± 0,28	0,14 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,48 ± 0,02	1,01 ± 0,02
Maió	36,32± 22,61	16,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,81 ± 0,00
Junho	70,21 ± 2,28	18,13 ± 0,28	0,20 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,54 ± 0,00	2,04 ± 0,11
Agosto	249,24 ± 14,14	55,12 ± 7,07	0,02 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,76 ± 0,01
Setembro	90,24 ± 2,28	20,08 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,33 ± 0,05	0,31 ± 0,02	1,10 ± 0,09
Novembro	22,35 ± 2,82	10,08 ± 2,56	0,05±0,00	0,24±0,00	0,13±0,01	0,68±0,02
Novembro	53,21 ± 5,21	21,35 ± 3,98	0,10±0,00	0,26±0,01	0,32±0,02	1,73±0,00

N.d- não foram determinados.

Os dados registados na tabela 3.6 indicam que a ocorrência de variações na concentração de todos os nutrientes, especialmente da amónia. Assim , o valor mínimo observado foi em Fevereiro (0,06 mg/L) e o valor máximo em Junho (2,04 mg/L).

A concentração de fosfatos oscilou entre 0,06 mg/L em Agosto e 0,54 mg/L em Junho. Os nitratos apresentaram o valor mínimo em Fevereiro (0,18 mg/L) e o valor máximo em Março (0,43 mg/L). O teor em nitritos variou entre 0,01 mg/L em Fevereiro e 0,20 mg/L em Junho.

Como se pode constatar, os valores mais elevados, para todos os parâmetros, foram na generalidade obtidos em Junho.

A variação mensal da percentagem de nutrientes é apresentada na figura 3.8.

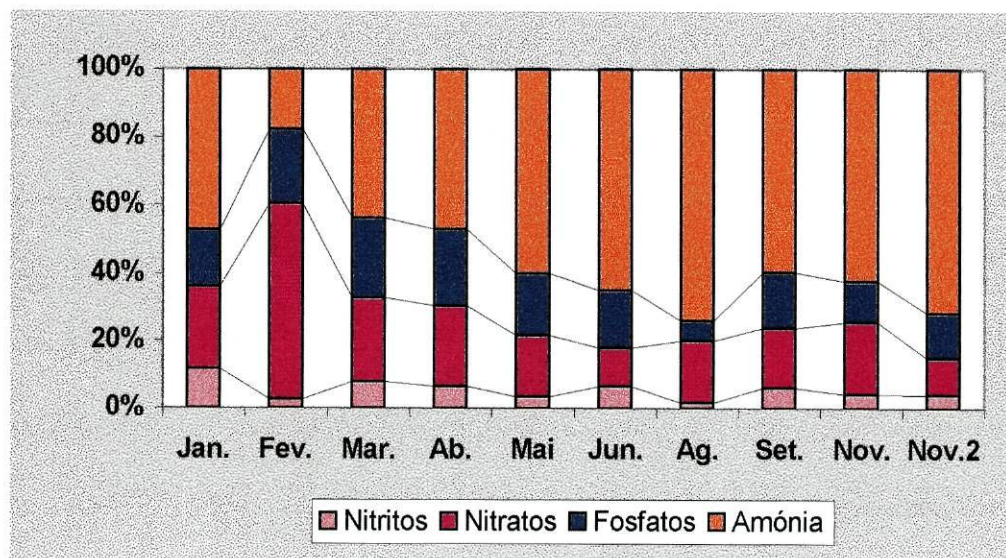


Figura 3.8 Variação da percentagem de nutrientes na água de entrada nos tanques de engorda.

Podemos observar que ocorrem variações na percentagem de todos os nutrientes, sendo a amónia, de uma maneira geral, o nutriente predominante na amostra, com excepção do mês de Fevereiro, em que os nitratos apresentam uma percentagem superior.

A análise de variância ($p < 0,05$) efectuada, para os parâmetros avaliados revelou a existência de diferenças significativas entre alguns dos meses avaliados. Assim os meses foram agrupados, para cada parâmetro, de acordo com a existência ou não de diferenças significativas.

Amónia :

Janeiro, Março, Maio, Agosto e Novembro (1) não diferem significativamente; Fevereiro significativamente diferente de todos ($p = 0,0002$); Junho significativamente diferente de todos ($p = 0,0002$) ; Novembro (2) significativamente diferente de todos ($p = 0,0002$), mas também diferente do valor obtido em Junho .

Nitratos:

Janeiro e Junho não diferem significativamente entre si ; Fevereiro, Agosto e Novembro não apresentam diferenças significativas entre si; Março difere significativamente de todos ($p = 0,0002$), mas com Janeiro e Abril $p = 0,003$; Abril difere significativamente de todos ($p = 0,0002$) ; Maio , Novembro (1) e Novembro (2) não diferem significativas entre si; Junho e Setembro não diferem entre si .

Fosfatos :

Janeiro, Maio e Novembro não diferem significativamente entre si ; Fevereiro , Agosto e Novembro não diferem significativamente entre si; Setembro e Novembro (2) não apresentam diferenças significativas entre si; Junho difere significativamente de todos os outros ($p = 0,00001$); Novembro (1) difere significativamente de todos os outros ($p = 0,0001$), excepto com o mês de Fevereiro, em que $p = 0,01$.

Como foi referido anteriormente, as condições de funcionamento da piscicultura são influenciadas por vários factores, nomeadamente o estado em que se encontra a maternidade e pré- engorda, e o regime hidráulico. Para se verificar a influência dos factores referidos na composição da água que entra na zona de engorda, foi efectuada uma análise de variância (ANOVA, para $p < 0,05$) entre os valores obtidos em A1 e em A2. Esta análise revelou que ocorrem diferenças significativas para todos os parâmetros, durante todas as colheitas, com excepção da colheita do mês de Fevereiro. Nesta, não há diferenças significativas entre os valores obtidos em A1 e em A2 para nenhum dos parâmetros determinados, ou seja, somente no mês de Fevereiro é que a água de entrada na engorda era essencialmente água de abastecimento da piscicultura.

Atendendo a que a água da amostra A₂ é sempre recirculada, em maior ou menor percentagem, foi construída uma tabela em que se indica a situação mais provável, relativamente à percentagem de mistura de águas em cada uma das amostragens realizadas. Assim, considera-se como referência o resultado do parâmetro amónia obtido na colheita realizada em Junho (2,04 mg/L), mês em que o regime era de circuito fechado, (100% de água recirculada).

Tabela 3.7- Percentagem provável de mistura em A2 no momento das colheitas

Meses	% de Água recirculada	% de Água nova
Janeiro	37	63
Fevereiro	3	97
Março	41	59
Abril	50	50
Maiο	40	60
Junho	100	0
Agosto	37	63
Setembro	54	46
Novembro (1)	33	67
Novembro (2)	85	15

Segundo os dados obtidos na amostra A2 existe mistura de água recirculada com água nova todos os meses, sendo Fevereiro o mês em que a percentagem de água recirculada é mais baixa (3%). Nos restantes meses o valor médio é da ordem dos 50% de água recirculada e 50% de água nova, quando a piscicultura funciona em regime semi- fechado.

CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE DO CONJUNTO DE TRÊS TANQUES (A3)

Nesta amostra, além das determinações efectuadas como nos casos anteriores, fez-se a determinação da razão N:P (átomo: átomo) para se avaliar a possibilidade da utilização deste efluente para o cultivo de microalgas.

Os dados obtidos estão representados na tabela 3.8 e na figura 3.9.

Tabela 3.8 Média mensal das concentrações e respectivos desvios padrão (n=3) dos nutrientes (mg/L) obtidos na amostra A3 no período de amostragens considerado: Sólidos suspensos totais (SST) e Sólidos suspensos voláteis (SSV). Nitritos (N-NO₂) ; Nitratos (N-NO₃) ; Amônia (N-NH₄⁺); Fosfatos (P-PO₄); e proporção N:P (átomo : átomo):

Meses/ Parâmetros	SST	SSV	N-NO ₂	N-NO ₃	P-PO ₄	N-NH ₄ ⁺	N:P
Janeiro	31,60 ± 0,00	16,05 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,93 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,86 ± 0,00	7:1
Fevereiro	60,21 ± 2,28	8,02 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,56 ± 0,09	0,43 ± 0,00	0,68 ± 0,00	5:1
Março	66,03 ± 1,37	38,31 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,43 ± 0,04	0,55 ± 0,00	0,99 ± 0,02	5:1
Abril	136,01 ± 5,56	34,21 ± 0,28	0,14 ± 0,00	0,30 ± 0,03	0,66 ± 0,02	1,29 ± 0,08	5:1
Maio	98,34 ± 14,40	18,07 ± 1,06	0,05 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,25 ± 0,00	1,51 ± 0,00	15:1
Junho	80,34 ± 2,28	185,21 ± 0,28	0,18 ± 0,00	0,61 ± 0,02	0,66 ± 0,00	4,90 ± 0,09	18:1
Agosto	275,43 ± 49	24,21 ± 2,27	0,11 ± 0,00	0,22 ± 0,02	0,27 ± 0,01	1,43 ± 0,08	14:1
Setembro	98,25 ± 14,46	24,00 ± 5,65	0,12 ± 0,00	0,39 ± 0,03	0,50 ± 0,01	1,90 ± 0,00	10:1
Novembro	74,31 ± 2,28	10,31 ± 2,28	0,13 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,46 ± 0,01	1,86 ± 0,00	10:1
Novembro	85,06 ± 0,21	25,53 ± 5,21	0,10 ± 0,00	0,49 ± 0,01	0,48 ± 0,00	2,44 ± 0,02	13:1

Os resultados evidenciam que, de uma maneira geral, o azoto sob a forma amoniacal é o material dissolvido que mais se evidencia na constituição do efluente dos três tanques. O valor máximo de amônia foi obtido em Junho (4,90 mg/L) e o valor mínimo em Fevereiro (0,68 mg/L). A concentração de fosfatos no efluente variou entre 0,25 mg/L em Maio e 0,66 mg/L em Junho. O teor em nitratos oscilou entre 0,22 mg/ L em Agosto e 0,61 mg/L em Junho. Os nitritos variaram entre 0,05 mg/L em Maio e 0,21 mg/L em Janeiro.

A razão N:P mais elevada (18:1) foi obtida no mês de Junho. A mais baixa foi de 5:1 nos meses de Fevereiro, Março e Abril.

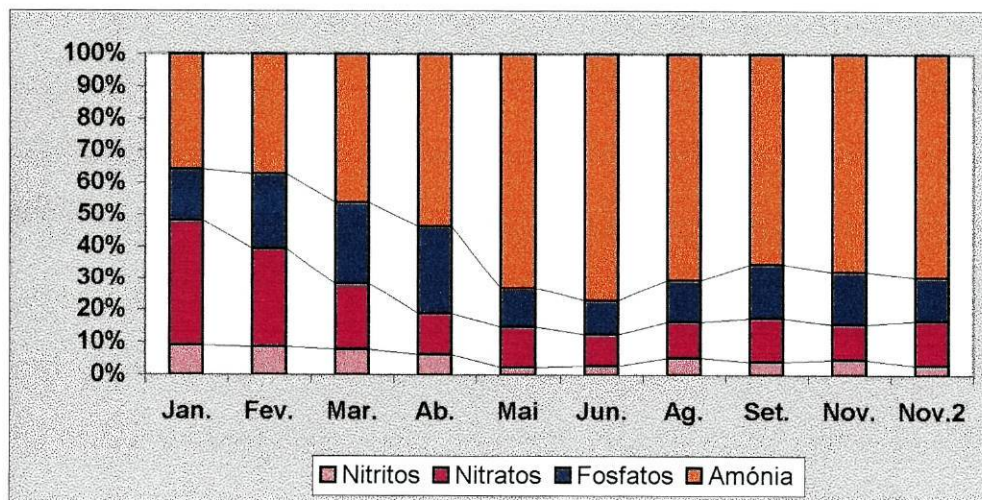


Figura 3.9- Variação da percentagem mensal dos parâmetros físico-químicos no efluente piscícola. Na figura 3.9 podemos constatar que a amónia é o constituinte do efluente que existe em maior percentagem em todos os meses amostrados, com excepção do mês de Janeiro, em que os nitratos predominam.

A análise de variância efectuada (ANOVA, para $p < 0,05$) para os parâmetros amónia, nitratos e fosfatos revelou a existência de diferenças significativas em algumas das amostragens realizadas. Assim, foram também constituídos grupos como nos casos anteriores:

Amónia :

Janeiro, Fevereiro e Março não diferem significativamente entre si; Abril, Maio, Agosto e Março não diferem significativamente entre si; Junho e Novembro diferem significativamente de todos os outros meses ($p= 0,0002$); Setembro e Novembro (1) não apresentam diferenças significativas entre si.

Nitratos :

Janeiro, Fevereiro, Maio, Junho, Agosto, Setembro e Novembro (2) diferem significativamente entre si ($p= 0,0001$); Abril e Novembro (1) não diferem significativamente entre si.

Fosfatos :

Janeiro e Fevereiro não diferem significativamente entre si; Março diferem significativamente de todos ($p= 0,0001$); Abril e Junho não diferem significativamente entre si, mas diferem de todos os outros ($p= 0,0001$); Maio e Agosto não diferem significativamente entre si;

SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS EM TODAS AS AMOSTRAS (A₁,A₂ E A₃)

Os valores dos sólidos suspensos totais (SST) obtidos para os três tipos de água amostrados estão patentes na figura 3.10.

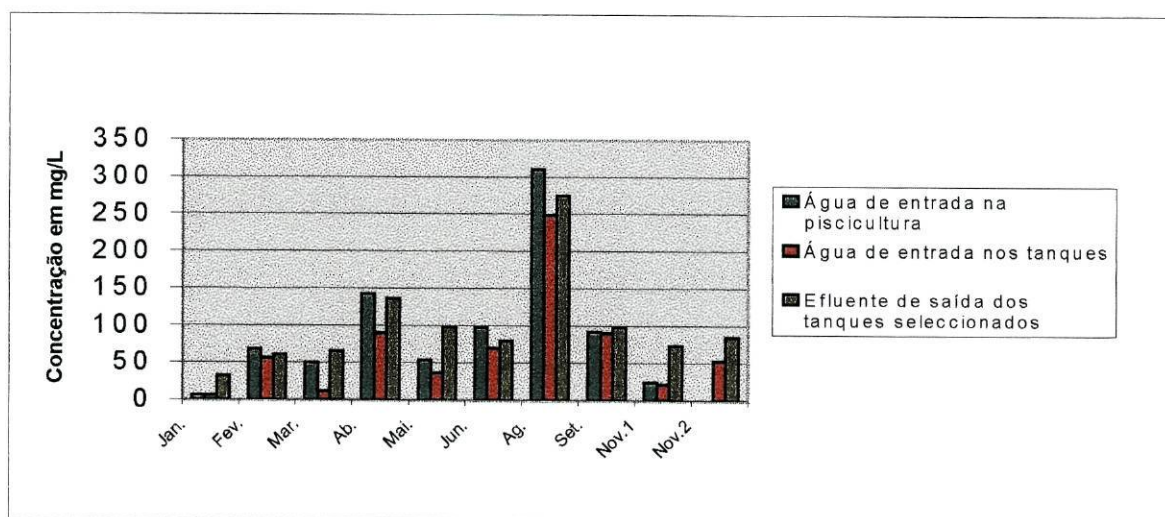


Figura 3.10. Médias mensais dos sólidos suspensos totais observados nas amostras efectuadas.

Nos valores representados na figura podemos salientar os referentes ao mês de Agosto na água de entrada, que são provavelmente consequências das marés vivas próprias dessa época do ano, na zona litoral onde se localiza a piscicultura.

Os valores correspondentes aos sólidos suspensos voláteis estão representados na figura 3.11.

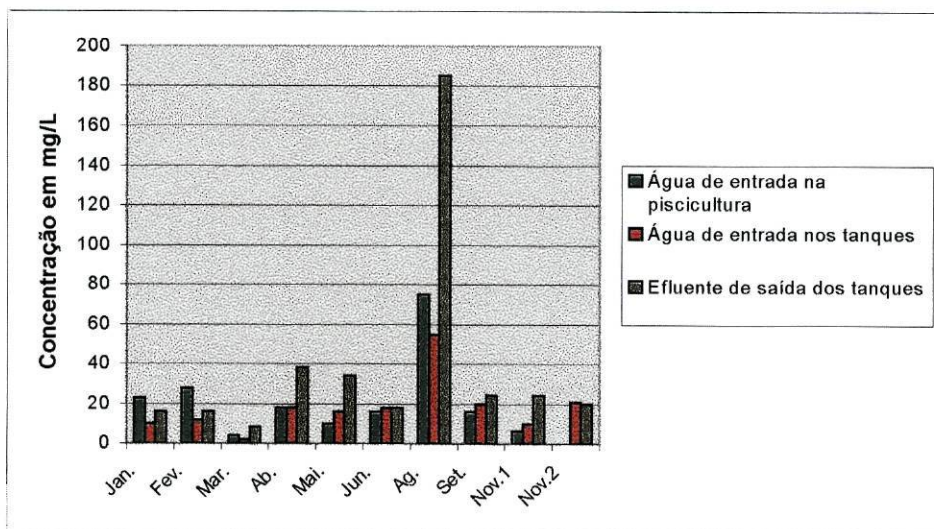


Figura 3.11- Médias mensais dos Sólidos suspensos voláteis nas amostras analisadas.

Pode verificar-se que os SSV no efluente de saída dos três tanques é sempre superior aos valores obtidos para as outras amostras. O valor mais elevado registou-se na colheita efectuada em Agosto (55 mg/L) e o mínimo em Fevereiro (8,02 mg/L).

CLOROFILA A

Relativamente à clorofila **a**, todas as análises realizadas às amostras mensais de A₁, A₂ e A₃ apresentavam valores de concentração sempre mais baixos que os limites de detecção da técnica de extracção por acetona (0,02mg/L). São de salientar alguns dos aspectos que poderão ter tido influência nestes resultados: a água de entrada na piscicultura não é geralmente só água do mar, os tanques de engorda amostrados encontram-se na penumbra, isto é com pouca luz, e a taxa de recirculação da água é muito levada, mesmo no decantador. Todos estes factores são desfavoráveis ao desenvolvimento de microalgas neste sistema.

3.2.4- ESTIMATIVAS DE PRODUÇÃO DE NUTRIENTES E DE MATÉRIA EM SUSPENSÃO NOS TANQUES ESTUDADOS

PRODUÇÃO DE NUTRIENTES

Efectuou-se a determinação da produção instantânea de nutrientes (A_3-A_2 em mg/L) nos tanques estudados, cujos resultados estão representados na figura 3.12

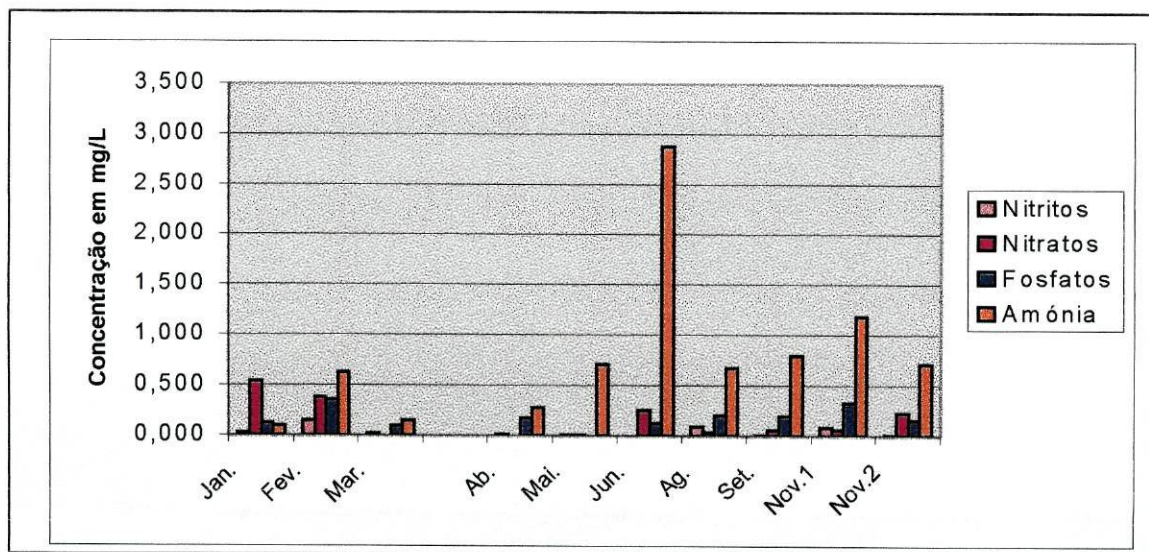


Figura 3.12- Produção média mensal de nutrientes observada nos três tanques em estudo

Confirma-se por esta análise que o azoto sob a forma amoniacal é o principal elemento produzido neste efluente. A produção de fosfatos é também evidente, com excepção do mês de Maio, e está de acordo com o que seria de esperar, atendendo à natureza do efluente, pois a produção de material dissolvido em efluentes deste tipo traduz-se por um aumento da concentração de azoto (amoniacal) e de fosfatos. A amónia corresponde, de uma maneira geral, a cerca de 75% do azoto dissolvido perdido.

A produção de nitratos e nitritos poderá estar relacionada não só com os tempos de residência da água nos tanques e no decantador, mas também com a taxa de recirculação da água. Assim, quando estes factores forem elevados poderá ocorrer nitrificação (completa ou incompleta) por acção bacteriana. No entanto, nos meses de Março e Maio não ocorreu produção de nitratos. Provavelmente, o tempo de residência da água nos tanques poderá não ter sido suficiente para a produção destes, mas apenas para a produção de nitritos, assim como se verificaram valores de temperatura mais elevados (21°C). que o normal. Em Junho, as condições

excepcionais de utilização, apenas, de água recirculada terão levado à nitrificação completa, tendo desaparecido os nitritos, que poderão ter sido convertidos em nitratos.

A carga de nutrientes (Kg/dia) produzidos nos tanques em estudo que é transportada pelo efluente durante um dia pode ser observada na figura 3.13

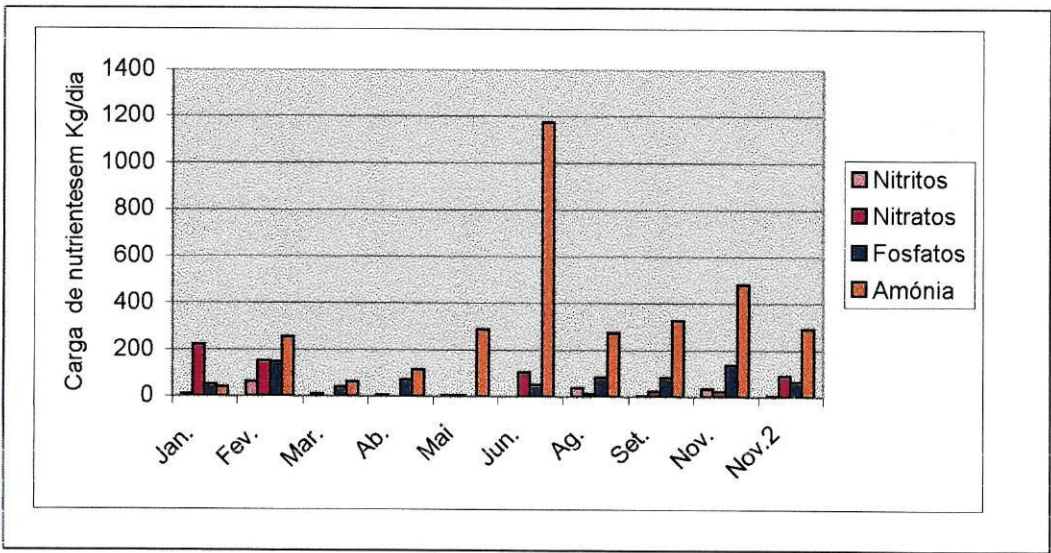


Figura 3.13 Carga média diária de nutrientes observados nos tanques em estudo.

Como se pode observar o azoto amoniacal é o constituinte mais abundante e o valor mais elevado ocorreu em Junho. Seguem-se os valores das cargas em nitratos.

A figura 3.14 traduz a importância do valor percentual médio da carga de cada um dos nutrientes para a composição do efluente estudado ao longo de um ano (média de 9 determinações)

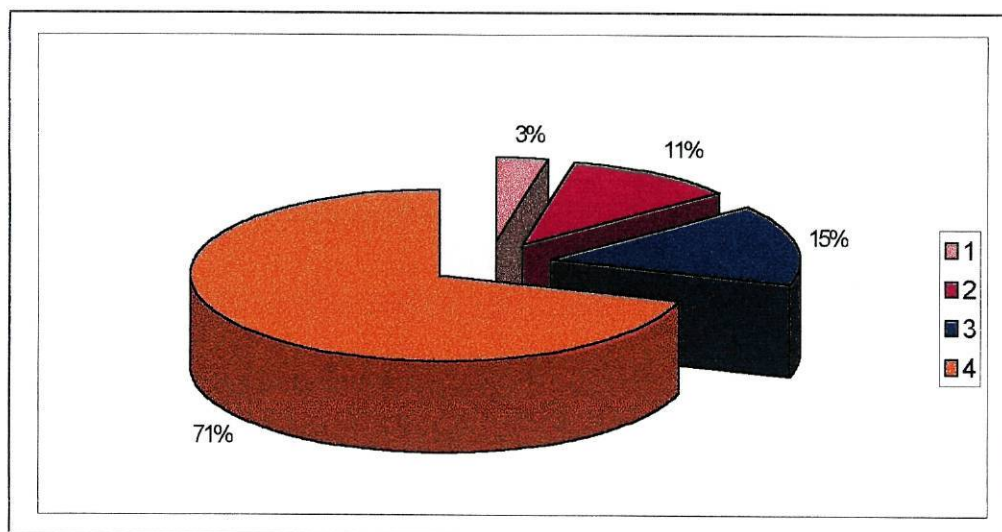


Figura 3.14. Valor médio percentual da carga de nutrientes (em Kg) produzida nos três tanques estudados ao longo de um ano. Legenda: 1 - nitritos; 2 - nitratos, 3 - fosfatos ; 4 - amónia

Novamente se verifica que a percentagem mais elevada corresponde ao azoto amoniacal, seguida dos fosfatos, nitratos e finalmente dos nitritos.

Do valor total de azoto (97%), 71% correspondem a amónia, o que era de prever em efluentes deste tipo.

PRODUÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS VOLÁTEIS

A produção de sólidos suspensos voláteis no efluente analisado pode ser observada na figura 3.15.

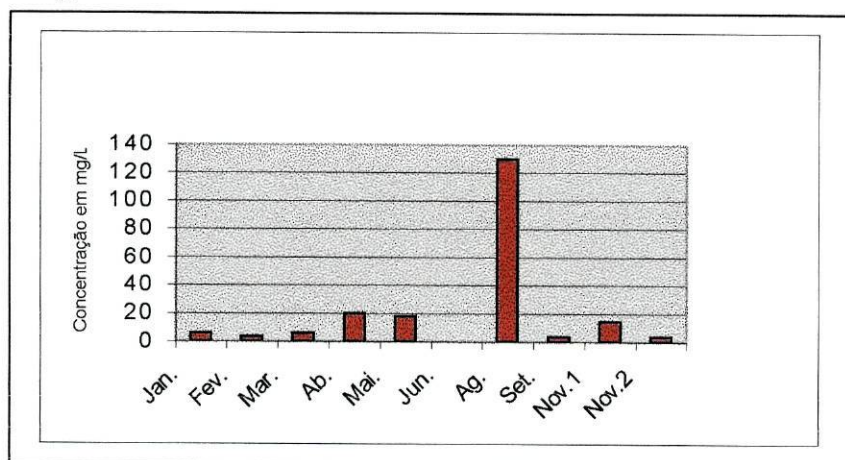


Figura 3.15. Produção de sólidos suspensos voláteis nos tanques em estudo.

A produção de SSV em maior quantidade verificou-se em Agosto, provavelmente devido à desinfecção que tinha sido efectuada poucos dias antes da amostragem. Em Junho a não produção poderá ser devida às condições excepcionais verificadas nesse

mês de utilização de água recirculada, que provavelmente transportava uma carga bacteriana elevada. Esta deverá ter efectuado a mineralização da matéria orgânica produzida.

PREVISÃO DA PRODUÇÃO DE NUTRIENTES PELA PISCICULTURA ESTUDADA

Na figura 3.16 apresenta-se uma previsão da produção de nutrientes na piscicultura, se estivessem em funcionamento 68 tanques com Pregado. De notar que esta estimativa foi feita com base na excreção média observada em 1,8 a 3 toneladas de peixe no conjunto dos três tanques estudados.

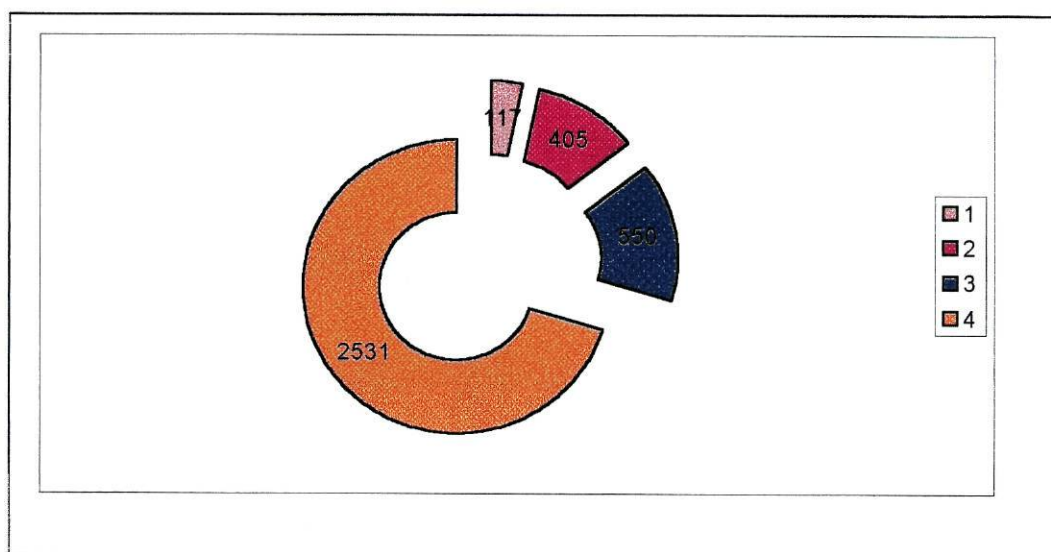


Figura 3.16. Previsão da produção diária de nutrientes na piscicultura em Kg.
Legenda: 1- nitritos; 2-nitratos ; 3 - fosfatos 4 - amónia.

Mais uma vez se constata que o nutriente mais produzido no efluente da zona de engorda é a amónia, seguida da produção de fosfatos, nitratos e em menor grau os nitritos.

Também foram efectuadas análises de regressão linear entre amónia produzida e a temperatura da água, o azoto total e o fósforo produzidos em relação às proteínas fornecidas, mas os valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram muito baixos.

3.2.5. INDUÇÃO NUTRICIONAL DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS

A indução de crescimento microalgal realizada a partir do mês de Abril com o meio de FABREGAS (1984) permitiu isolar uma microalga autóctone a partir da água de entrada na piscicultura (amostra A1), que se supõe pertencer ao género *Tetraselmis*. A microalga apresenta as características seguintes:

- cor verde;
- forma ovalada;
- célula flagelada (4 flagelos);
- 4-9 μm de diâmetro e 12-16 μm de comprimento,
- formação de cistos arredondados (figura 3.17);
- pirenóide bem visível;
- sulco na face posterior
- presença de tecas (duas)

Os registos fotográficos efectuados podem ser observados na figura 3.17. Na fase final da redacção deste trabalho tivemos a confirmação, mediante recurso a um especialista francês da Universidade de Caen de que, efectivamente, a alga isolada pertence ao género *Tetraselmis* . Contudo, os estudos necessários ao conhecimento da espécie isolada requerem a utilização de técnicas de microscopia electrónica, que estão fora do âmbito do presente trabalho.

Esta microalga foi utilizada em ensaios posteriores com meios de referência e com o efluente proveniente do conjunto dos três tanques em estudo. Pôde assim, começar-se o estudo da sua cinética de crescimento e da sua capacidade de utilização no tratamento do efluente piscícola amostrado (ver resultados dos ensaios com microalgas).

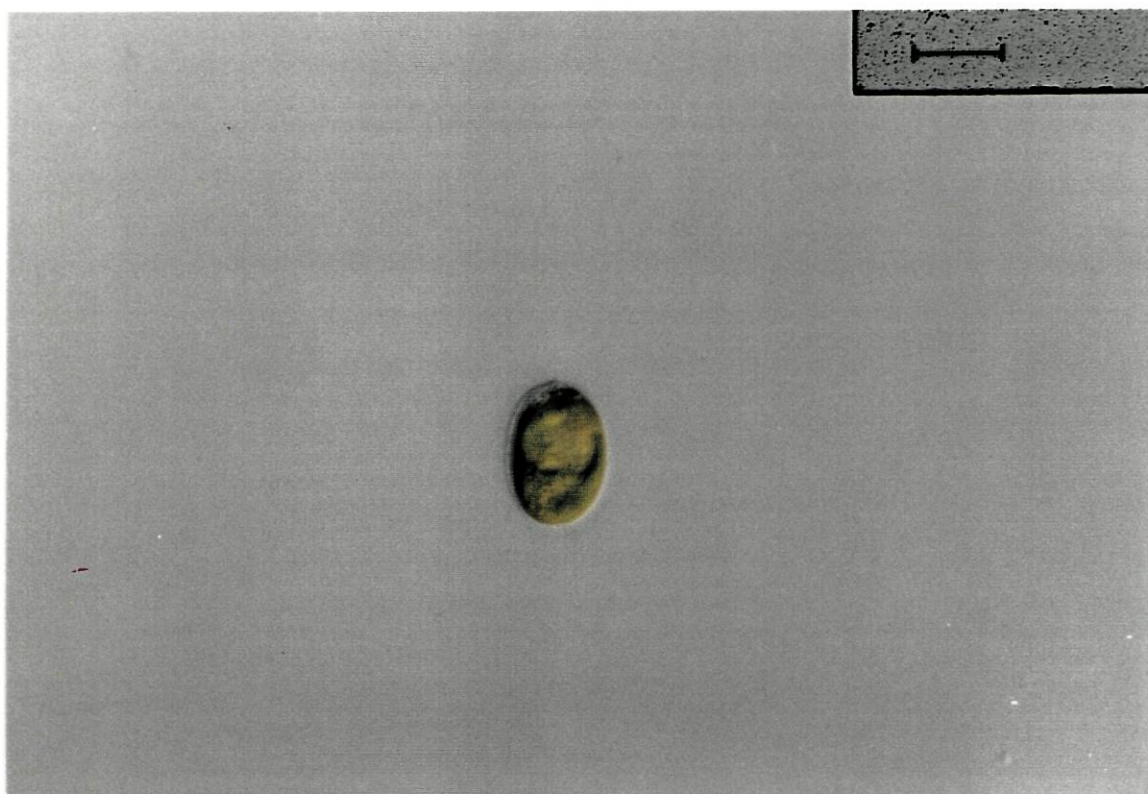


Figura 3.17. Microalga autóctone isolada a partir de amostras A1;

3.3. Ensaaios com microalgas

Nos ensaios realizados utilizaram-se três espécies diferentes de microalgas: *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* e uma espécie autóctone isolada - *Flagelado*. Para cada microalga foram realizados dois ensaios nos quais se utilizaram como meios de cultura, os meios de FABREGAS *et al.*, (1984), e de GUILLARD (1975) no primeiro, e o meio de Fabregas e o Efluente proveniente do conjunto de três tanques em estudo, em bruto ou com correcção de azoto (ou de silício, no caso de *Phaeodactylum tricornutum*), no segundo ensaio.

Para facilitar a escrita de texto, o meio de FABREGAS *et al.*, (1984) será designado apenas por meio de Fabregas e o meio de GUILLARD (1975) por meio de Guillard.

3.3.1. ENSAIOS COM *Phaeodactylum tricornutum*

SELECÇÃO DO MELHOR MEIO DE REFERÊNCIA

Este ensaio teve como objectivo fazer a selecção do melhor meio de referência para *Phaeodactylum tricornutum*, a ser utilizado posteriormente como controlo nos ensaios com o Efluente. Os meios de cultura utilizados foram o meio de Fabregas e o meio de Guillard, preparados com água do mar autoclavada, segundo as indicações dos seus autores. Atendendo a que *Phaeodactylum tricornutum* é uma diatomácea adicionou-se sílica ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) ao meio de Fabregas com uma concentração final de 106 μM (6,53mg/L, Guillard, 1972).

Seguidamente, apresentam-se os resultados obtidos relativamente a cada um dos parâmetros analisados.

A variação da **densidade óptica** obtida nos dois meios está representada na figura 3.18.

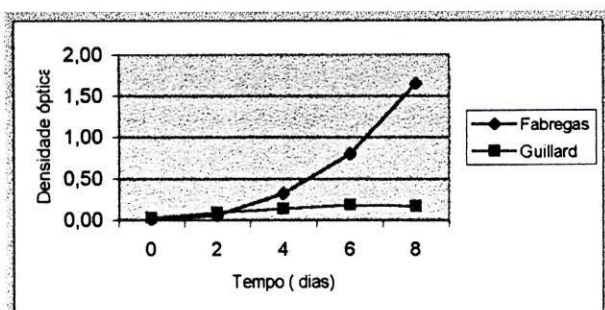


Figura 3.18- Variação da densidade óptica de *P. tricornutum* ao longo do tempo quando cultivada em meio de Fabregas e meio de Guillard.

Verifica-se que nos primeiros quatro dias os valores da densidade óptica obtidos em cada meio foram semelhantes. A partir deste dia a densidade óptica foi superior no meio de Fabregas.

A análise estatística efectuada (ANOVA) revelou existirem diferenças significativas entre os dois meios a partir do 4º dia, para $p < 0.05$, promovendo o meio de Fabregas maior crescimento.

A **densidade celular** obtida em cada um dos meios pode ser observada na figura 3.19.

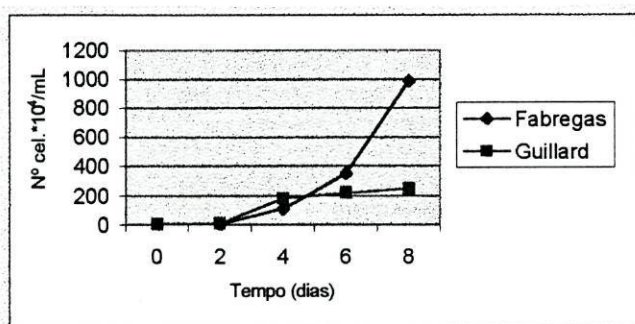
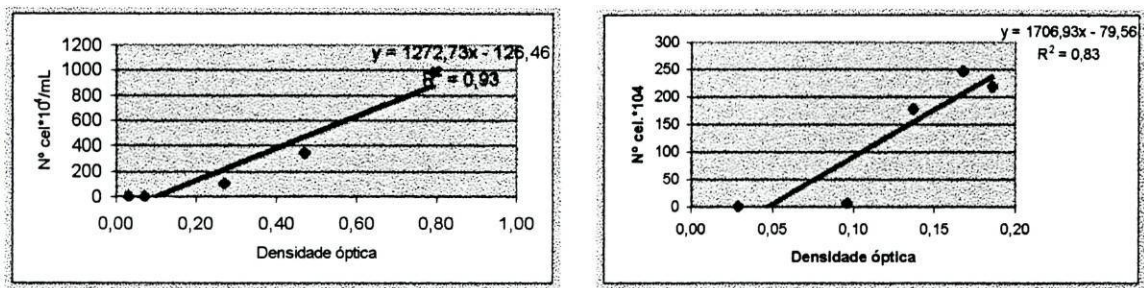


Figura 3.19 Variação da densidade celular de *P. tricornutum* quando cultivada em meio de Fabregas e meio de Guillard.

O crescimento observado começou por ser mais acentuado no meio de Guillard nos primeiros quatro dias. A partir do 4º dia, o comportamento inverteu-se, sendo os valores mais elevados de densidade celular obtidos no meio de Fabregas, atingindo-se 985×10^4 cel. /mL ao 8º dia. No meio de Guillard a densidade máxima também foi obtida ao 8º dia com o valor de 247×10^4 cel. /mL, ou seja 25,07% do meio de Fabregas.

A análise ANOVA efectuada (para $p < 0,005$) revelou existirem diferenças significativas entre os dois meios a partir do 4º dia .

Efectuando-se uma análise de regressão linear entre os valores de densidade celular e de densidade óptica obtidos , verificou-se que os valores de R^2 (coeficiente de determinação) foram de 0,93 para o meio de Fabregas e de 0,83 para o meio de Guillard , encontrando-se as equações das respectivas rectas de regressão linear traduzidas na figura 3.20.



A- Meio de Fabregas

B- Meio de Guillard

Figura 3.20 Relação entre a densidade óptica e o número de células de *P. tricornutum* ao longo do tempo quando cultivada em dois meios diferentes: meio de Fabregas (A) e meio de Guillard (B).

A taxa de crescimento obtida, assim como o número de duplicações diárias observadas em cada um dos meios durante o tempo experimental estão registados na tabela 3.9.

Tabela 3.9- Taxa de crescimento e número de duplicações obtidas com *P. tricornutum* quando cultivada em meio de Fabregas e meio de Guillard

Meios	Taxa de crescimento (μ)				Duplicações			
Dias	2	4	6	8	2	4	6	8
Fabregas	0,35±0,01	1,43±0,03	0,82±0,00	0,49±0,00	0,51±0,01	2,06±0,05	1,18±0,01	0,71±0,00
Guillard	0,65±0,02	1,58±0,02	0,06±0,01	0,09±0,00	0,95±0,03	2,28±0,07	0,09±0,00	0,13±0,01

Observando a tabela podemos constatar que a taxa de crescimento foi efectivamente superior no meio de Guillard nos dois primeiros dias, o mesmo se passando para o número de duplicações, tendo diminuído de seguida.

A **biomassa** (sólidos suspensos) e os **pigmentos celulares** (clorofila a e feopigmentos) existentes no meio de cultura foram determinados ao 8º dia para ambos os meios , estando os resultados obtidos registados na tabela 3.10. Nesta, também se pode observar o teor de **clorofila a por célula**.

Tabela 3.10 Biomassa (sólidos suspensos totais e voláteis) , pigmentos (cla a e feopigmentos) e clorofila a/cel em *P. tricornutum* após 8 dias de cultura.

Meios	Biomassa (mg/L)		Pigmentos (mg/L)		
	SST	SSV	Clorofila a	Feopigmento	Cla/cel (pg/cel)
Fabregas	145,10 ± 10,51	73,01 ± 8,24	7,28 ±15,10	0,610 ± 2,42	0,79 ± 3,23
Guillard	49,33 ± 11,09	40,08 ± 4,35	0,30 ± 0,21	0,025 ± 0,00	0,01± 0,05

Pode observar-se que o meio de Fabregas é o que potencia uma maior produção final de biomassa e de pigmentos. A quantidade de clorofila por célula é também superior no meio de Fabregas.

As **dimensões** e o **biovolume** (inicial e final) obtidos para esta microalga (n=30), não sofreram alterações ao longo do período experimental. Assim, as dimensões registadas foram entre 8-12 X20-24 (µm) e o **biovolume** entre 334,93 e 904,31 (µm³).

A evolução dos valores de **pH**, para os meios testados, foi também determinada , estando a sua variação traduzida na figura seguinte.

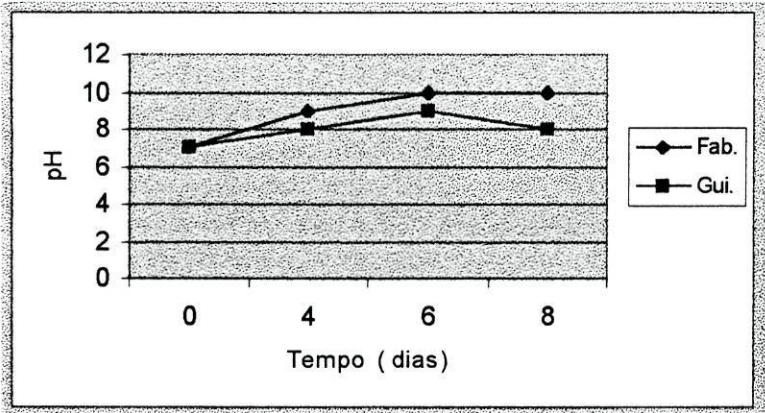


Figura 3.21- Variação do pH das culturas de *P. tricornutum* no meio de Fabregas e no meio de Guillard ao longo do tempo .

Como se pode observar o pH aumentou em ambos os meios nos primeiros dias . No entanto, a partir do 6º dia o pH diminuiu no meio de Guillard . No meio de Fabregas o valor de máximo de pH foi 10, atingido ao 8º dia.

A **salinidade** variou entre 34 e 37‰ em ambos os meios, efectuando-se correcções com água destilada autoclavada sempre que necessário.

Os **nutrientes** que restaram em cada meio, no fim do tempo experimental, foram analisados após a remoção das microalgas por filtração com um filtro Whatman GF/C (após duas passagens). Os resultados obtidos estão traduzidos na tabela 3.11. Nesta tabela também se apresentam o valor inicial de cada nutriente assim como a **remoção** (em percentagem) de cada nutriente principal conseguida com esta microalga.

Tabela 3.11 Média das concentrações inicial e final dos nutrientes (mg/L) nos diferentes meios de cultura (n=3) e respectivos desvios- padrão: amónia (N-NH₄), Silicatos(SO₃); fosfatos(P-PO₄) e nitratos (N-NO₃). Remoção de nutrientes em percentagem.

* No meio de Fabregas ocorreu produção de amónia.

Meios	Tempo	Amónia(mg/L)	Silicatos (mg/L)	Fosfatos(mg/L)	Nitratos(mg/L)
Fabregas	Inicial	0,03 ± 0,00	6,53 ± 0,00	3,14 ± 0,00	28,24 ± 0,00
	Final	0,19 ± 0,05	0,31 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,69 ± 0,05
	Remoção	*	95,25 ± 4,18	99,12 ± 0,38	97,57 ± 0,18
Guillard	Inicial	9,00 ± 0,00	6,53 ± 0,00	1,16 ± 0,00	0,17 ± 0,00
	Final	1,29 ± 0,03	5,55 ± 0,21	0,04 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	Remoção	91,52 ± 1,98	13,50 ± 3,39	95,82 ± 1,21	90,88 ± 11,24

No meio de Fabregas a percentagem de remoção dos nutrientes doseados foi sempre superior a 95%. Verifica-se que a microalga remove praticamente todo o azoto sob a forma de nitratos existentes no meio , que eram inicialmente de 28,24mg/L. No meio de Guillard os nitratos inicialmente existentes são muito baixos (0,17mg/L) e a percentagem de remoção observada foi ligeiramente inferior ao meio de Fabregas.

Em ambos os meios a percentagem de remoção do fósforo foi superior a 97%. No entanto, convém referir que o valor inicial de fósforo em meio de Fabregas é muito superior ao do meio de Guillard (3,14 mg/L comparativamente a 1,16 mg/L).

Os silicatos foram removidos em ambos os meios, mas a percentagem de remoção foi superior no meio de Fabregas (95,25 %) relativamente ao meio de Guillard (13,5%).

Relativamente à amónia existente no meio de Guillard esta foi removida na ordem dos 91%. Contudo, no meio de Fabregas ocorreu produção de amónia (0,16 mg/L), pois a amónia inicial (proveniente da água do mar) era inferior ao valor final.

Face aos resultados obtidos neste ensaio quanto aos parâmetros avaliados, o meio de Fabregas foi seleccionado como o meio de referência a ser utilizado no ensaio com o Efluente.

CRESCIMENTO E REMOÇÃO DE NUTRIENTES POR *Phaeodactylum tricornutum* CULTIVADA NO EFLUENTE PISCÍCOLA

Este ensaio foi realizado com o objectivo de utilizar o Efluente da piscicultura em estudo, como meio para a produção de microalgas e, simultaneamente, avaliar a capacidade de remoção dos compostos azotados e fosfatados nele existente pela microalga em estudo. O efluente foi proveniente da amostragem do mês de Junho apresentando uma razão N:P de 18:1, muito próxima da do meio de referência (20:1). Atendendo a que a espécie a utilizar era uma diatomácea decidiu-se também testar o efeito de uma correcção do Efluente apenas relativamente ao silício, adicionando-se para tal 6,53mg/L de sílica ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Guillard,1972) ao efluente. Para o meio de Fabregas procedeu-se de modo idêntico ao do ensaio anterior adicionando-se, igualmente sílica (6,53 mg/L). A razão N:P:Si, no Efluente após Correcção era de 18:1:5

A **densidade óptica** obtida nas culturas com os três meios ensaiados está representada na figura 3.22.

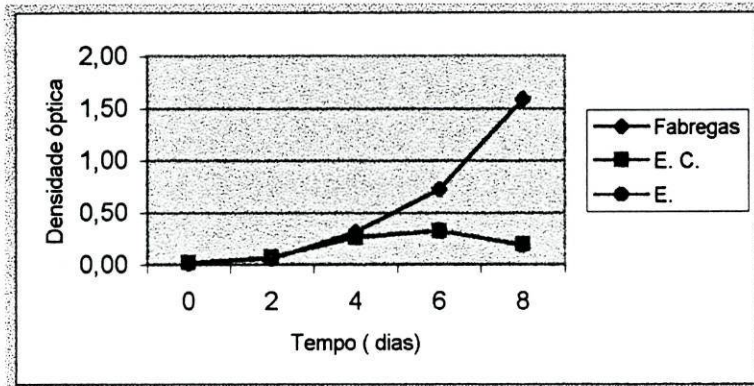


Figura 3.22 . Variação da densidade óptica de *P. tricornutum* ao longo do tempo quando cultivada em três meios diferentes: meio de Fabregas , o Efluente com Correção (EC.) e o Efluente sem correção (E.)

Pode ver-se que a espécie não apresentou dificuldades de adaptação ao Efluente, quer com Correção, quer sem Correção. Contudo, a partir do 4º dia, os valores de densidade óptica no meio de Fabregas são superiores ao dobro dos obtidos no meio de Guillard. Os Efluentes apresentaram valores muito semelhantes entre si para este parâmetro.

A análise de variância efectuada revelou diferenças significativas para a densidade óptica entre o meio de Fabregas e o Efluente com Correção e entre o meio de Fabregas e o Efluente sem Correção a partir do 4º dia ,para $p < 0.05$.

Entre os Efluentes testados não se observaram diferenças significativas em nenhum dos tempos.

A variação da **densidade celular** obtida neste ensaio pode ser observada na figura 3.23

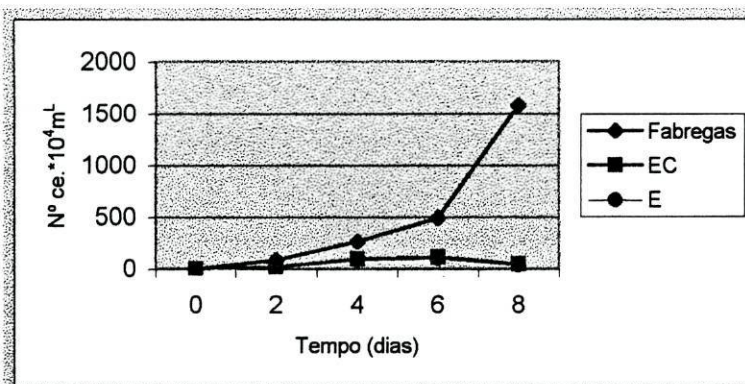
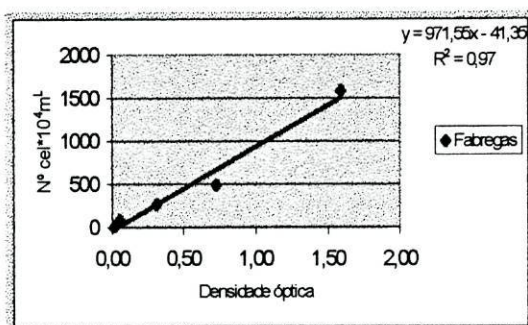


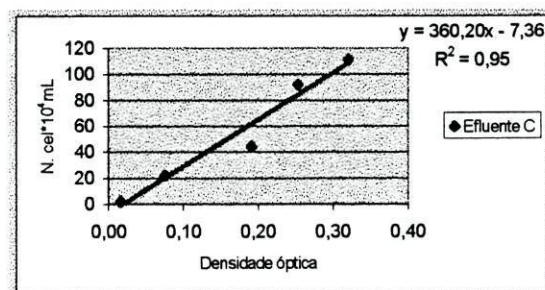
Figura 3.23. Variação da densidade celular de *P. tricornutum* ao longo do tempo quando cultivada em três meios diferentes: meio de Fabregas , Efluente com Correção(EC) e Efluente sem correção (E).

Verifica-se que a densidade celular mais elevada foi obtida com o meio de Fabregas. No Efluente com Correção e sem Correção os valores obtidos são muito semelhantes e sempre muito inferiores ao do meio de referência. A densidade máxima obtida no meio de referência foi de $1560 \times 10^4 \text{ cel/mL}$, enquanto que no Efluente com Correção foi de 45×10^4 e no Efluente sem Correção foi de $35 \times 10^4 \text{ cel/mL}$. A análise de variância efectuada revelou diferenças significativas para a densidade celular entre o meio de Fabregas e o Efluente com Correção e sem Correção já a partir do 2º dia, para $p < 0,05$. Entre os Efluentes detectaram-se diferenças significativas apenas para o 2º dia.

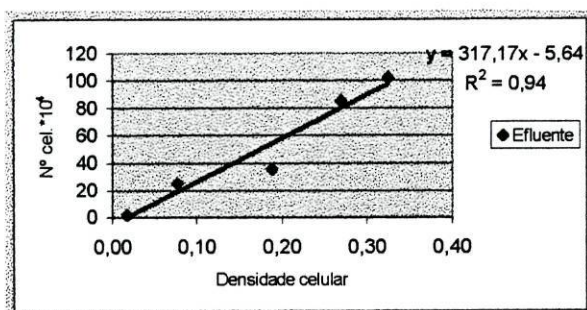
Tendo-se efectuado uma análise de regressão linear entre os valores de densidade celular e de densidade óptica, verificou-se que o valor de R^2 (coeficiente de determinação) para o meio de Fabregas foi de 0,97, para o Efluente Corrigido foi 0,95 e para o Efluente não corrigido foi 0,94, encontrando-se as respectivas equações da recta de regressão linear traduzidas na figura 3.24.



A- Meio de Fabregas



B- Efluente com Correção



C- Efluente sem Correção

Figura 3.24. Relação entre a densidade óptica e o número de células de *P. tricornutum* ao longo do tempo quando cultivada no meio de Fabregas (A), no Efluente com Correção (B) e no Efluente sem Correção (C).

Na tabela 3.12 apresentam-se os valores obtidos para a **taxa de crescimento** e o **número de duplicações/ dia** observada em cada um dos meios ao longo do tempo da cultura.

Tabela 3.12 Valores da taxa de crescimento e do número de duplicações diárias obtidos com *P. tricornutum*, em função de diferentes meios de cultura.

Meios	Taxa de crescimento (μ)				Duplicações			
	2º dia	4º dia	6º dia	8º dia	2º dia	4º dia	6º dia	8º dia
Fabregas	1,83 ± 0,02	0,59 ± 0,01	0,31 ± 0,03	0,58 ± 0,02	2,66 ± 0,02	0,86 ± 0,01	0,46 ± 0,03	0,85 ± 0,02
Efluente C	1,19 ± 0,01	0,719 ± 0,02	0,09 ± 0,01	-0,46 ± 0,01	1,73 ± 0,01	1,04 ± 0,02	0,14 ± 0,01	-0,67 ± 0,01
Efluente	1,26 ± 0,04	0,61 ± 0,05	0,08 ± 0,01	-0,52 ± 0,08	1,82 ± 0,04	0,89 ± 0,05	0,12 ± 0,01	-0,75 ± 0,08

A taxa de crescimento e o número de duplicações mais elevadas para os três meios de cultura foram obtida no 2º dia. Para os Efluentes, no 8º dia a taxa de crescimento e o número de duplicações apresentavam valores inferiores a zero.

A **biomassa seca** e os **pigmentos celulares** (clorofila a e feopigmentos) existentes nos meios de cultura foram determinados ao 8º dia para todos os meios estando os resultados obtidos registados na tabela 3.13. Também se apresenta a **quantidade de clorofila a por célula**.

Tabela 3.13 Biomassa (sólidos suspensos totais e voláteis) , pigmentos (clorofila a e feopigmentos) clorofila a/cel ,para *P. tricornutum*, quando cultivada em meios diferentes.

Meios	Biomassa (mg/L)		Pigmentos (mg/L)		Clorofila <u>a</u> /cel
	SST	SSV	Clorofila <u>a</u>	Feopigmentos	pg/cel
Fabregas	440,10 ± 11,31	268,00 ± 5,65	13,8 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,88
Efluente C	82,00 ± 2,82	56,03 ± 11,31	2 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,42
Efluente	148,01 ± 5,16	54,02 ± 8,48	0,2 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,39

A biomassa obtida no meio de Fabregas foi superior à do Efluente com Correção ou sem Correção. A produção de pigmentos também foi mais elevada no meio de referência .

A produção de clorofila por célula no meio de Fabregas duplicou relativamente aos Efluentes, com Correção ou sem Correção.

As **dimensões** apresentadas pela microalga não sofreram alterações ao longo do período experimental, estando estas compreendidas entre 8 - 12 X 20 - 24 (μm). O **biovolume** apresentado também não sofreu alterações e esteve compreendido entre 334,93 e 904,32 (μm^3).

Os valores de **pH**, para os meios testados, foram também medidos , estando a sua variação traduzida na figura seguinte.

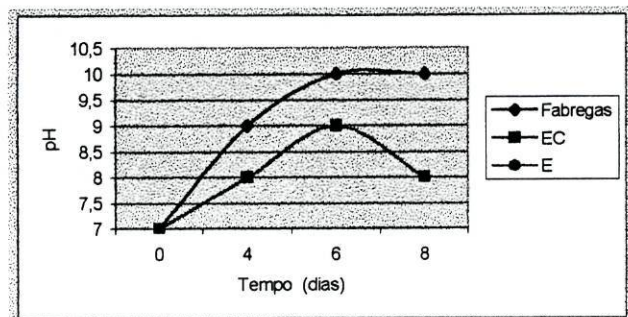


Figura 3.25- Variação do pH das culturas de *P. tricornutum*, em três meios diferentes.

Como seria de esperar o pH no meio de Fabregas aumentou, enquanto que no Efluente com Correção e sem Correção apesar do aumento nos primeiros dias, ocorreu depois uma forte diminuição. O valor mais elevado foi obtido a partir do 6º dia em meio de Fabregas. Nos Efluentes o valor de pH baixou de 9 para 8 a partir do 6º dia.

A **salinidade** variou entre 35 e 38 ‰ em todos os meios de cultura., efectuando-se correções com água destilada autoclavada, sempre que necessário .

Como no ensaio anterior, procedeu-se à análise físico-química dos meios de cultura utilizados, para a determinação dos nutrientes principais. As culturas foram filtradas duas vezes com filtros GF/C, para se proceder à remoção das microalgas. Os

resultados estão descritos na tabela 3.14. Nesta tabela também se apresenta o valor inicial de nutrientes em cada meio e a percentagem de remoção observada em cada uma das situações analisadas.

Tabela 3.14. Média das concentrações e respectivos desvios- padrão (n=3) dos nutrientes (mg/L) no meio de Referência, no Efluente com Correção e no Efluente sem Correção com *P. tricornutum* : Silicatos (Si-SiO₂); Nitratos (N-NO₃) ; Amónia (N-NH₄⁺); Fosfatos (P-PO₄). Remoção de nutrientes em percentagem.

- Ocorreu produção de amónia

Meios	Tempo	Amónia	Silicatos	Fosfatos	Nitratos
Fabregas	Inicial	0,05 ± 0,00	6,53 ± 0,00	3,14 ± 0,00	28,24 ± 0,00
	Final	0,15 ± 0,05	3,17 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,46 ± 0,05
	Remoção	*	51,48 ± 0,02	98,62 ± 0,03	98,43 ± 0,02
Efluente C	Inicial	4,91±0,08	6,53 ± 0,00	0,66±0,00	0,61 ± 0,01
	Final	0,12 ± 0,01	4,07 ± 0,17	0,00±0,00	0,05 ± 0,00
	Remoção	97,47± 0,29	37,64 ± 0,02	100± 0,00	91,82 ± 0,18
Efluente	Inicial	4,91±0,08	_____	0,66±0,00	0,61 ± 0,01
	Final	0,04 ±0,01	_____	0,00±0,00	0,36 ± 0,00
	Remoção	99,13± 0,16	_____	100 ± 0,3	41,20 ± 11,0

Relativamente aos parâmetros determinados, os resultados obtidos permitem concluir que não há efeito da correção com silício do Efluente utilizado como meio de cultura sobre a remoção de amónia e dos fosfatos. A percentagem de remoção de azoto sob a forma amoniacal é em ambos os meios superior a 97% e a remoção de fosfatos é total. Contudo, para os nitratos, a percentagem de remoção no Efluente com Correção duplicou quando comparada com a percentagem observada para o Efluente sem silício.

Por comparação com meio de Fabregas podemos observar que a remoção de nitratos é inferior nos Efluentes, pois no meio de Fabregas é da ordem dos 98,43% e nos Efluentes varia entre 91,82% (no Efluente com Correção) e 41,205 no Efluente sem Correção .

A percentagem de remoção dos fósforo foi de cerca de 100% no Efluente com Correção e sem Correção, ligeiramente superior à obtida no meio de Fabregas que foi de 98,62%.

O silício sob a forma de silicatos não foi removido completamente pelas microalgas no meio com o Efluente Corrigido (37,64%). No entanto, em meio de Fabregas, a remoção foi melhor e da ordem dos 50%.

3.3.2. ENSAIOS COM *Tetraselmis suecica*

SELECÇÃO DO MELHOR MEIO DE REFERÊNCIA

Este ensaio teve como objectivo fazer a selecção do melhor meio de referência para *Tetraselmis suecica* , a ser utilizado posteriormente nos ensaios com o Efluente. Os meios de cultura utilizados foram o meio de Fabregas e o meio de Guillard, preparados com água do mar autoclavada e segundo as indicações dos respectivos autores.

Na figura 3.26 apresenta-se a variação da **densidade óptica** obtida nos dois meios para o tempo experimental considerado.

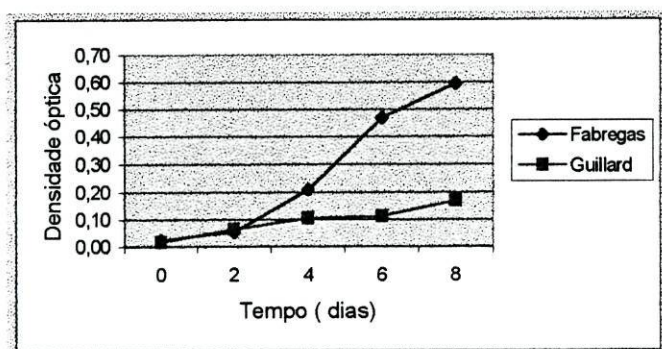


Figura 3.26. Variação da densidade óptica da cultura de *T. suecica* ao longo do tempo quando cultivada em dois meios diferentes: o meio de Fabregas e de Guillard.

A densidade óptica foi semelhante nos primeiros dias para os dois meios testados, Fabregas e Guillard. Na figura apresentada podemos constatar que a partir do 4º dia já é bem evidentes a diferença entre a densidade óptica nos dois meios. Se tivessem sido efectuadas contagens no 3º dia provavelmente esta diferença ter-se-ia observado já nesse tempo.

A análise de variância efectuada, confirmou existirem, para $p < 0,05$, de facto diferenças significativas entre o meio de Fabregas e o meio de Guillard , para a densidade óptica, a partir do 4º dia.

A **densidade celular** obtida nos dois meios de cultura pode ser observada na figura 3.27.

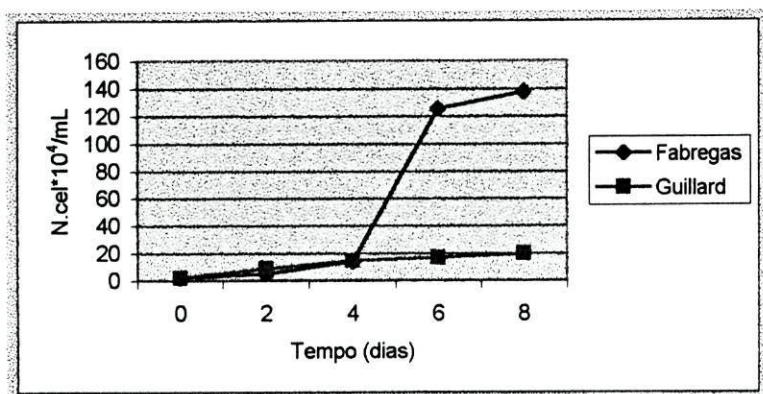
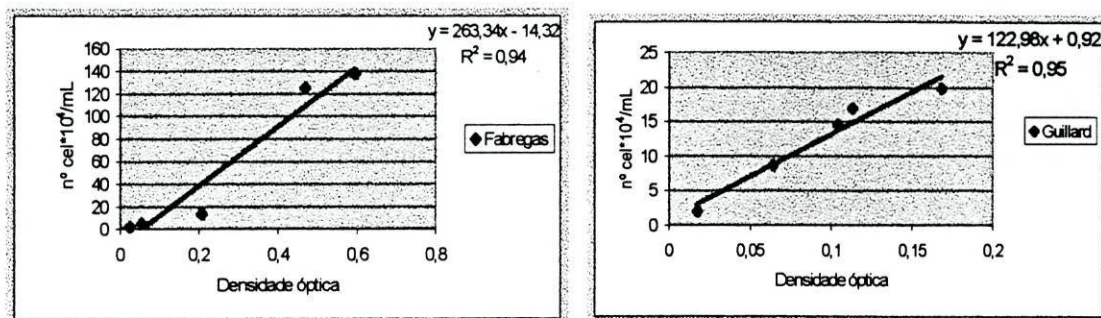


Figura 3.27. Variação da densidade celular obtida com *T. suecica* quando cultivada em meio de Fabregas e meio de Guillard.

Nota-se que *Tetraselmis suecica* não apresentou dificuldades de adaptação em nenhum dos meios de cultura utilizados. A partir do quarto dia os valores da densidade celular em meio de Fabregas são mais elevados do que em meio de Guillard. A densidade celular máxima obtida em Fabregas foi de 138×10^4 no 8º dia e a densidade celular máxima obtida em Guillard foi de 20×10^4 no 8º dia.

A análise ANOVA efectuada para $p < 0,05$ revelou existirem diferenças significativa entre os dois meios de cultura, para a densidade celular, a partir do 6º dia. É de salientar que as contagens foram efectuadas de dois em dois dias; se tivessem sido efectuadas diariamente, provavelmente teríamos observado diferenças já a partir do 5º dia.

Efectuando-se uma análise de regressão linear entre os valores de densidade celular e de densidade óptica, verificou-se que o valor de R^2 (coeficiente de determinação) para o meio de Fabregas foi de 0,94, e para o meio de Guillard foi de 0,95, encontrando-se as respectivas equações das rectas de regressão linear traduzidas na figura 3.28.



A- Meio de Fabregas

B- Meio de Guillard

Figura 3.28. Relação entre a densidade óptica e o número de células para *T. suecica* ao longo do tempo quando cultivada em dois meios diferentes: meio de Fabregas (A) e meio de Guillard (B).

Na tabela 3.15 apresenta-se a taxa de crescimento obtida, assim como o número de duplicações diárias observada em cada um dos meios ao longo do tempo experimental considerado.

Tabela 3.15 Taxa de crescimento e número de duplicações obtidas com *Tetraelmis suecica* cultivada em meios de Fabregas e de Guillard.

Meios	Taxa de crescimento (μ)				Duplicações			
Dias	2	4	6	8	2	4	6	8
Fabregas	0,45 ± 0,00	0,51 ± 0,05	1,10 ± 0,05	0,04 ± 0,00	0,65 ± 0,00	0,74 ± 0,05	1,59 ± 0,05	0,07 ± 0,05
Guillard	0,73 ± 0,00	0,26 ± 0,03	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,03	1,06 ± 0,00	0,37 ± 0,03	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,03

No meio de Fabregas a taxa de crescimento e o número de duplicações aumentaram sempre ao longo do tempo excepto no último dia. Em meio de Guillard a taxa de crescimento e o número de duplicações foram superiores aos valores com meio de Fabregas ao 2º dia, mas depois ambos os valores sofreram um decréscimo acentuado.

Os **pigmentos celulares** (clorofila a e feopigmentos) e a **biomassa** (sólidos suspensos) existentes, foram determinados para os diferentes meios de cultura no tempo 8º, estando os resultados obtidos registados na tabela 3.16. Nesta também se pode observar a quantidade de **clorofila a** por célula.

Tabela 3.16 Biomassa (sólidos suspensos totais e voláteis) , pigmentos (cla a e feopigmentos) e clorofila a/célula obtidos em *T. suecica*, quando cultivada em dois meios diferentes.

Meios	Biomassa (mg/L)		Pigmentos (mg/L)		Cla/cel (pg/cel)
	SST	SSV	Clorofila a	Feopigmento	
Fabregas	210,00 ± 42,42	140,00 ± 28,28	2,80 ± 0,09	0,04 ± 0,00	2,03 ± 0,00
Guillard	45,00 ± 7,07	30,00 ± 14,14	0,15 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,77 ± 0,00

Verificou-se que a maior produção de pigmentos e de biomassa foi obtida em meio de Fabregas , assim como o teor de cla **a** por célula.

As **dimensões** e o **biovolume** (mínimos e máximos) de *T. suecica* no início do ensaio eram os seguintes: 8-10 x 12-14 (µm) e 401,92 e 723,66 (µm³). Estes dois parâmetros não apresentam alterações no final do ensaio.

O **pH**, só possível determinar apenas no último dia de cultura devido a uma avaria no aparelho de medida utilizado. Os resultados obtidos no 8º dia são os seguintes: meio de Fabregas, 8,9 e meio de Guillard, 7,9.

Os **nutrientes** que restaram em cada meio, após 8 dias de cultura, foram analisados depois das microalgas serem removidas por filtração com filtros da Whatman GF/C (duas passagens) estando os resultados obtidos traduzidos na tabela 3.17. Nesta tabela também está patente a percentagem de **remoção** obtida para cada nutriente face ao valor inicial destes em cada meio.

Tabela 3.17 Média das concentrações e respectivos desvios padrão (n=3) inicial (I) e final (F) dos nutrientes (mg/L) nos diferentes meios de cultura : amónia (N-NH₄), nitratos (N-NO₃), fosfatos (P-PO₄) de *T. suecica* .Remoção de nutrientes em percentagem.
 * No meio de Fabregas ocorreu produção de amónia (0,11mg/L).

Meios	Tempo	Amónia(mg/L)	Fosfatos(mg/L)	Nitratos(mg/L)
Fabregas	Inicial	0,03 ± 0,00	3,14 ± 0,00	28,24 ± 0,00
	Final	0,11 ± 0,03	0,00 ± 0,01	0,36 ± 0,00
	Remoção	*	100,00 ± 0,00	99,1± 0,18
Guillard	Inicial	9,00 ± 0,00	1,16 ± 0,00	0,17 ± 0,00
	Final	0,11 ± 0,06	0,00 ± 0,0	0,01 ± 0,00
	Remoção	96,37± 0,82	100,00 ± 0,00	93,37± 0, 12

No meio de Fabregas verifica-se que esta microalga remove praticamente todo o azoto (99,1%) presente sob a forma de nitratos, a fonte de azoto deste meio. No meio de Guillard o azoto sob a forma de nitratos existente é o que provem da água do mar utilizada para preparar o meio, e é também praticamente todo removido.

O azoto amoniacal, fonte de azoto no meio de Guillard, é removido numa percentagem da ordem dos 96%.

A percentagem de remoção do fósforo foi da ordem dos 100%, quer em meio de Fabregas, quer em meio de Guillard.

Atendendo aos resultados obtidos para os parâmetros avaliados, o meio de Fabregas foi seleccionado como o meio de referência a ser utilizado no ensaio seguinte.

CRESCIMENTO E REMOÇÃO DE NUTRIENTES POR *Tetraselmis suecica*, CULTIVADA NO EFLUENTE PISCÍCOLA

A realização deste ensaio teve como objectivo a utilização do Efluente como meio de cultura de *Tetraselmis suecica* e a avaliação da capacidade de remoção de compostos azotados e fosfatados existentes no efluente por esta.

O Efluente utilizado foi a amostra procedente do mês de Agosto, em que a razão N:P era 14:1 Efectuou-se uma correcção com NH₄ Cl de modo a obter-se uma razão N:P de 19:1 , razão próxima do meio de referência.

Seguidamente, apresentam-se os parâmetros determinados. Na figura 3.29 pode observar-se a variação ocorrida da **densidade óptica** nos três meios.

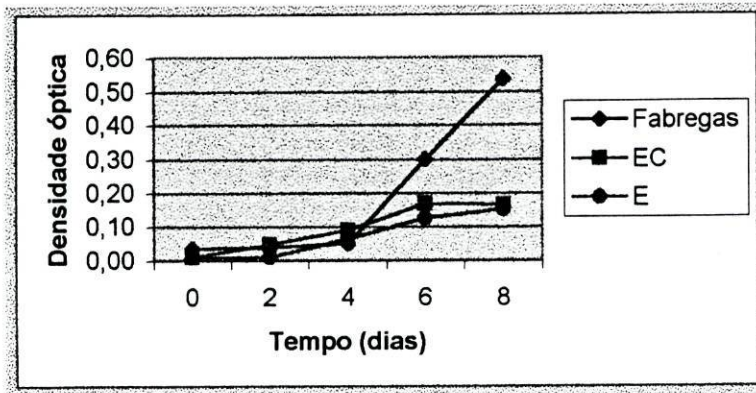


Figura 3.29. Variação da densidade óptica da cultura de *T. suecica* ao longo do tempo quando cultivada em três meios diferentes: meio de Fabregas ; Efluente com Correção (EC) e Efluente sem Correção (E).

Os valores de densidade óptica revelam um certa instabilidade no comportamento desta microalga. Assim, observaram-se algumas dificuldades de adaptação nos três meios. Só no 4º dia é que se nota um aumento nos valores da densidade óptica .

A ANOVA efectuada para $p < 0,05$ revelou existirem diferenças significativa entre os meios de cultura só a partir do 6º dia. É de salientar que se as contagens fossem diárias as diferenças ter-se-iam observado mais cedo. Entre os efluentes não ocorreram diferenças significativas em nenhum dos tempos considerados.

Os valores obtidos para a **densidade celular** observada nos três meios utilizados são apresentados na figura 3.30.

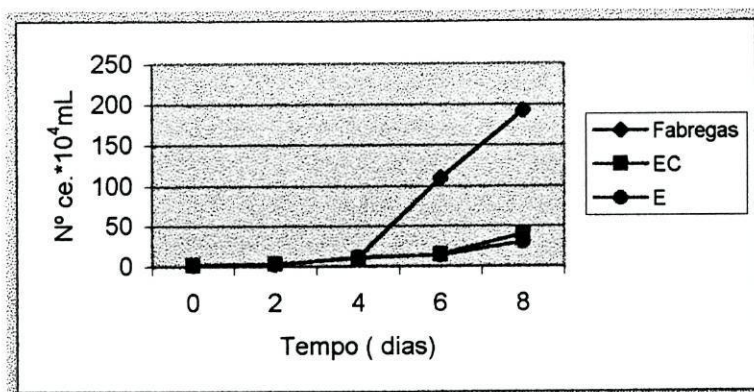


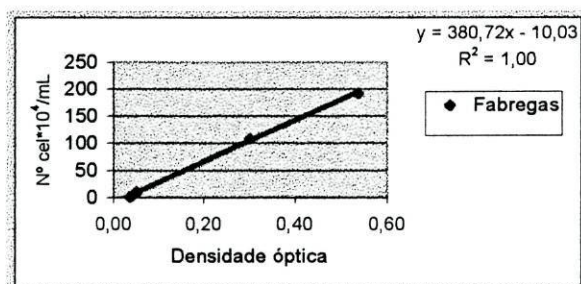
Figura 3.30. Variação da densidade celular de *T.suecica*, ao longo do tempo quando cultivada em três meios diferentes: meio de Fabregas , Efluente com Correção (EC) e Efluente sem correcção (E).

A densidade celular também revela que esta microalga apresentou alguma dificuldade de adaptação aos meios; no entanto, no meio de Fabregas, a partir do 4º dia a densidade celular aumentou. No Efluente com Correção e sem Correção ocorreu um ligeiro aumento somente a partir do 6º dia, mas de valor inferior ao do meio de referência. A densidade celular máxima obtida em Fabregas foi de 192×10^4 /mL ao 8º dia. No Efluente com Correção alcançaram-se 39×10^4 /mL e no Efluente sem Correção, 30×10^4 /mL ao 8º dia.

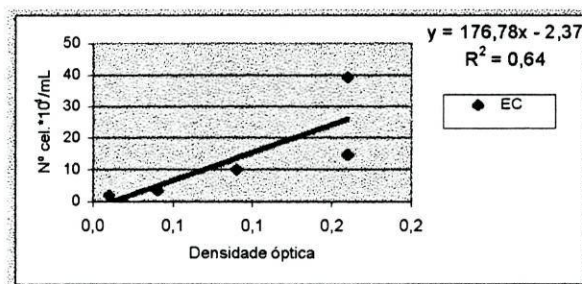
A análise de variância, para $p < 0,05$, revelou diferenças significativas para a densidade celular nos três meios de cultura a partir do quarto dia inclusive.

Entre os efluentes as diferenças relativamente à densidade celular foram significativas, a partir do 6º dia.

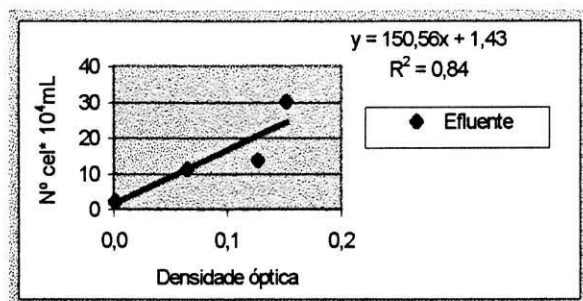
A análise de regressão linear realizada entre os valores de densidade celular e de densidade óptica obtida nos três meios, encontra-se representada na figura 3.31. Os valores de R^2 foram os seguintes: meio de Fabregas 1; Efluente com Correção 0,64 e Efluente sem Correção 0,84.



A- Fabregas



B- Efluente com Correção



C- Efluente sem Correção

Figura 3.31- Relação entre a densidade óptica e o número de células de *T. suecica* ao longo do tempo quando cultivada com Fabregas(A), Efluente com Correção (B) e Efluente sem Correção (C)

Na tabela 3.18 apresentam-se os registos correspondentes à **taxa de crescimento (μ)** e **número de duplicações/ dia** observada em cada um dos meios, ao longo do tempo.

Tabela 3.18 Valores da taxa de crescimento e do número de duplicações obtidos com *T. suecica*

Meios/Dias	Taxa de crescimento (μ)				Duplicações			
	2	4	6	8	2	4	6	8
Fabregas	0,11 ± 0,00	0,78 ± 0,05	1,16 ± 0,05	0,27 ± 0,00	0,15 ± 0,00	1,12 ± 0,05	1,68 ± 0,05	0,39 ± 0,05
Efluente c/ Correção	0,31 ± 0,00	0,14 ± 0,03	0,37 ± 0,00	0,65 ± 0,03	0,45 ± 0,00	0,20 ± 0,03	0,54 ± 0,00	0,95 ± 0,03
Efluente	0,04 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,49 ± 0,00	0,06 ± 0,05	1,08 ± 0,05	0,11 ± 0,03	0,71 ± 0,00

Assim como foi observado para a densidade celular, esta microalga apresentou uma instabilidade nos valores obtidos para a taxa de crescimento e o número de duplicações por dia.

Os **pigmentos celulares** (clorofila a e feopigmentos) e a **biomassa** (sólidos suspensos) existentes no meio de cultura ao 8º dia estão patentes na tabela 3.19, assim como o teor em **clorofila a** por célula.

Tabela 3.19 Pigmentos (clorofila a e feopigmentos) e biomassa (sólidos suspensos totais e voláteis) em mg/L e clorofila a em pg./cel, para *T. suecica* cultivada em diferentes meios.

Meios	Biomassa (mg/L)		Pigmentos (mg/L)		Cla/cel (pg/cel)
	SST	SSV	Clorofila a	Feopigmento	
Fabregas	138,02 ± 2,83	56,00 ± 0,00	1,460 ± 0,23	0,02 ± 0,00	0,76 ± 0,15
Efluente c/ Correção	70,23 ± 2,83	48,21 ± 3,81	0,16 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,410 ± 0,84
Efluente s/ Correção	92,03 ± 5,66	34,00 ± 4,99	0,040 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,06

Verifica-se que a maior produção de pigmentos ocorre no meio de Fabregas. Entre os Efluentes é o Efluente com Correção aquele que potencia uma maior produção de pigmentos. A biomassa mais elevada é também obtida no meio de Fabregas.

As **dimensões celulares** e por conseguinte o **biovolume**, aumentaram em todos os meios utilizados sendo o valor mais elevado observado em Fabregas. O valor inicial das dimensões celulares (em μm) era igual em todos os meios e foi de $8-10 \times 12-14$, (valores mínimo e máximo). Em Fabregas, o valor final foi $10-12 \times 14-16$. No Efluente constata-se que o Efluente com Correção proporcionou um ligeiro aumento para este parâmetro ($8-12 \times 12-14$), relativamente ao obtido no Efluente sem Correção ($8-12 \times 10-14$).

O biovolume inicial (mínimo e máximo em μm^3) foi, 401,92 e 732,66 em todos os meios. O biovolume final (μm^3) registado foi : meio de Fabregas, 732,66 e 1025,73;; Efluente com Correção, 401,23 e 1055,04; Efluente sem Correção 334,93 e 1055,04.

O pH registado nestas culturas aumentou nos primeiros dias em todos os meios, verificando-se uma descida deste nos meios com Efluente a partir do 4º dia, conforme se pode observar na figura 3.32.

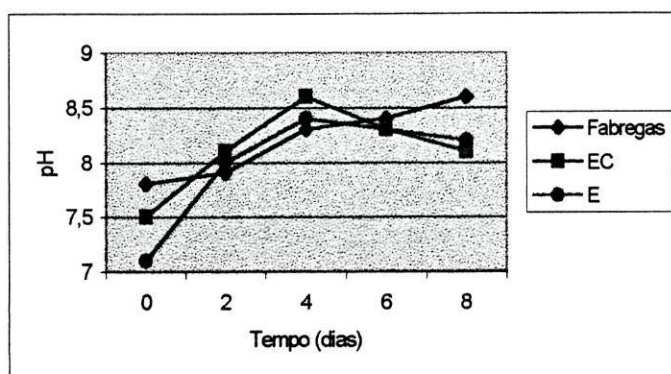


Figura 3.32. Variação do pH das culturas de *T. suecica*.

(EC)- Efluente com Correção; (E) Efluente sem Correção

A **salinidade** variou entre 35 e 37‰ ao longo deste ensaio sendo corrigida com água destilada autoclavada, sempre que necessário.

Na tabela 3.20 encontram-se registados os valores obtidos para os nutrientes existentes nos meios de cultura, utilizados neste ensaio, assim como o valor da remoção de cada nutriente em percentagem.

Tabela 3.20. Tabela. Média das concentrações e respectivos desvios- padrão (n=3) dos nutrientes (mg/L): Silicatos (Si-SiO₂); Nitratos (N-NO₃) ; Amónia (N-NH₄⁺); Fosfatos (P-PO₄) e remoção de nutrientes, em percentagem, em *T. suecica* quando cultivada no meio de Referência, no Efluente com Correção e no Efluente sem Correção.

Meios	Tempo	Amónia	Fosfatos	Nitratos
Fabregas	Inicial	0,01 ± 0,00	3,14 ± 0,00	28,24 ± 0,00
	Final	0,20 ± 0,00	0,18 ±	0,41 ± 0,00
	Remoção	*	96,07 ± 3,43	98,56 ± 0,00
Efluente C	Inicial	2,11 ± 0,00	0,27 ± 0,00	0,22 ± 0,00
	Final	0,23 ± 0,06	0,13 ± 0,00	0,02 ± 0,00
	Remoção	92,89 ± 6,52	51,85 ± 0,00	90,91 ± 0,00
Efluente	Inicial	1,43 ± 0,00	0,27 ± 0,00	0,22 ±
	Final	0,31 ± 0,04	0,15 ± 0,00	0,13 ± 0,00
	Remoção	85,55 ± 12,69	62,96 ± 15,71	40,91 ± 0,00

A análise destes resultados permite dizer que *Tetraselmis suecica* remove praticamente todo o azoto existente no meio de Fabregas, assim como o fósforo. Para ambos os nutrientes a remoção é superior a 95%.

No Efluente a microalga apresenta um comportamento diferente consoante este é corrigido ou não. No Efluente com Correção a remoção do azoto é superior, quer para o azoto sob a forma de amónia, quer sob a forma de nitratos.

A remoção do fósforo, pelo contrário, é maior no Efluente sem correção relativamente ao Efluente com correção, sendo no entanto, menor do que a obtida no meio de referência.

3.3.3. ENSAIOS COM O *FLAGELADO* (ESPÉCIE AUTÓCTONE)

SELECÇÃO DO MELHOR MEIO DE REFERÊNCIA

O objectivo deste ensaio foi seleccionar o melhor meio de referência para a espécie, com a finalidade de o utilizar posteriormente em ensaios com o Efluente piscícola . Os meios de cultura utilizados foram novamente o meio de Fabregas e o meio de Guillard. Estes meios foram preparados segundo as indicações dos seus autores com água do mar autoclavada. Os resultados obtidos neste ensaio são seguidamente apresentados nas figuras e tabelas abaixo indicadas.

Na figura 3.33 pode observar-se a variação da **densidade óptica** obtida nos dois meios ao longo do tempo de cultura.

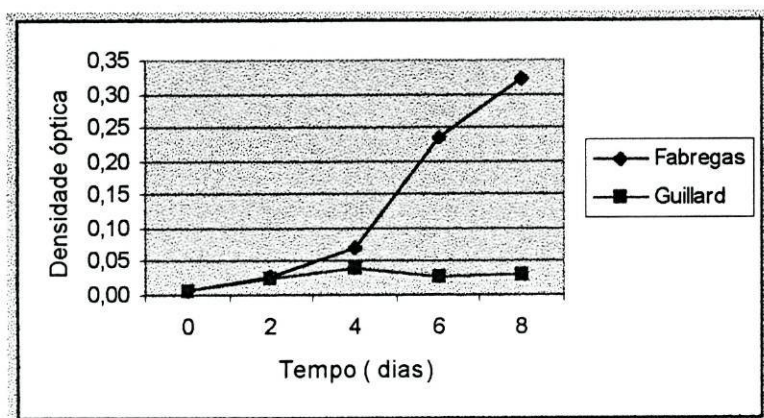


Figura 3.33 - Variação da densidade óptica da cultura de *Flagelado* ao longo do tempo quando cultivado em dois meios diferentes: Fabregas e Guillard.

Como se pode observar o *Flagelado* não apresentou problemas de adaptação aos meios, pois constata-se um bom arranque quer no meio rico em nitratos (Fabregas) quer no meio rico em amónia (Guillard) .

A análise estatística efectuada (ANOVA) para $p < 0,05$, revelou diferenças significativas entre o meio de Fabregas e o meio de Guillard , para a densidade óptica, somente a partir do 6º dia .

Os valores obtidos para o parâmetro **densidade celular** estão representados na figura 3.34

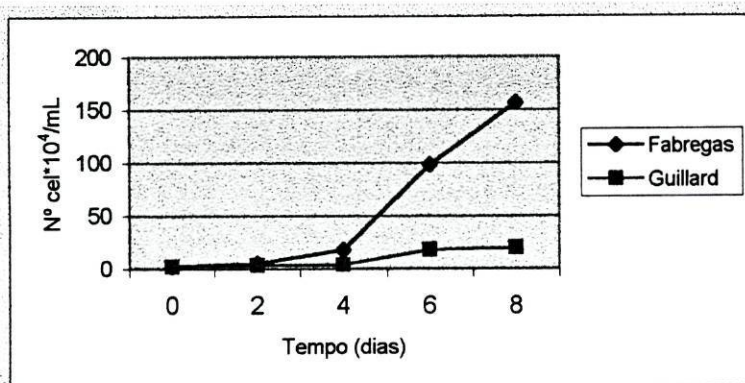


Figura 3.34. Variação da densidade celular obtida com o *Flagelado* quando cultivado em meio de Fabregas e meio de Guillard.

Verifica-se que a densidade celular começa a aumentar logo nos dois meios nos primeiros dias, o que denota uma boa adaptação da espécie aos meios. A partir do 4º dia constata-se que a densidade celular continuou a aumentar em Fabregas, mas não em Guillard. Neste meio ocorreu, contudo um ligeiro aumento entre o 4º e o 6º dia. A densidade máxima obtida em Fabregas foi de 156×10^4 cel./mL enquanto que em Guillard foi de apenas 20×10^4 cel./mL, ambas no último dia da cultura.

A análise estatística efectuada (ANOVA) para $p < 0,05$ relativamente à densidade celular, revelou diferenças significativas, nos dois meios de cultura, a partir do 2º dia.

Usando uma análise de regressão linear entre os valores de densidade celular e de densidade óptica, pode verificar-se que o valor de R (coeficiente de determinação) para o meio de Fabregas foi de 0,99. Para o meio de Guillard o valor deste coeficiente foi muito baixo, da ordem dos 0,20. A equação da recta de regressão obtida em meio de Fabregas pode observar-se na figura 3.35.

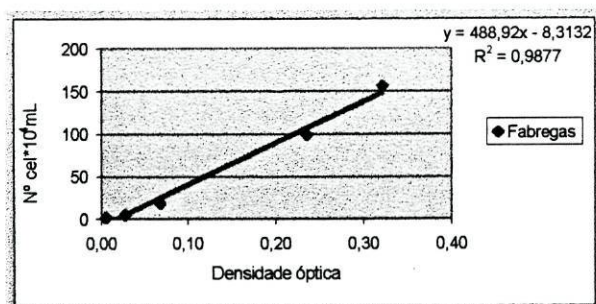


Figura 3.35. Relação entre a densidade óptica e o número de células do *Flagelado* ao longo do tempo quando cultivado em meio de Fabregas.

A taxa de crescimento o número de duplicações diárias obtidas, em cada um dos meios durante o tempo experimental estão registados na tabela 3.22.

Tabela 3.22- Taxa de crescimento e número de duplicações obtidas com o *Flagelado* quando cultivado nos meios de Fabregas e de Guillard.

Meios/ Dias	Taxa de crescimento (μ)				Duplicações			
	2	4	6	8	2	4	6	8
Fabregas	0,38± 0,06	0,64± 0,10	0,92± 0,23	0,21± 0,07	0,55± 0,06	0,93± 0,01	1,33± 0,23	0,30± 0,00
Guillard	0,22± 0,01	0,10± 0,03	0,64± 0,02	0,15± 0,03	0,32± 0,00	0,14± 0,01	0,92± 0,01	0,22± 0,02

A taxa de crescimento e o número de duplicações foram superiores em Fabregas, aumentando sempre até ao 6º dia . Em Guillard estes dois parâmetros apresentaram um comportamento instável.

A **biomassa** (sólidos suspensos) os **pigmentos celulares** (clorofila a e feopigmentos) assim como a quantidade de **clorofila a** por célula, existentes no meio de cultura ao 8º dia para ambos os meios ensaiados, estão registados na tabela 3.23.

Tabela 3.23. Biomassa , pigmentos celulares e clorofila a/célula verificada nos meios de cultura testados para o *Flagelado*.

Meios	Biomassa (mg/L)		Pigmentos (mg/L)		Cla/cel (pg/cel)
	SST	SSV	Clorofila a	Feopigmento	
Fabregas	280,00 ±0,00	200,00±0,00	7,85 ± 0,38	0,05 ±0,00	5,03 ± 0,01
Guillard	140,00± 0,00	40,00± 0,00	0,18 ± 0,06	0,07 ±0,00	0,89 ±0,00

Pode observar-se que é no meio de Fabregas que existem condições para a maior produção de pigmentos, assim como de biomassa.

Efectuaram-se, como nos ensaios anteriores para as outras microalgas , a determinação das dimensões celulares e do respectivo biovolume para o *Flagelado*. Esta microalga apresentava no início do ensaio as dimensões (valor mínimo e máximo) e o biovolume seguintes: 8-10 x 12-14 (μm) e 401,92 e 732,66 (μm^3). No final do ensaio constatamos que as dimensões e, consequentemente o biovolume sofreram alterações apenas no meio de Fabregas. Assim, as dimensões celulares finais

observadas foram 8-10 x 12-16 (valor mínimo e máximo) e o biovolume 401,92 e 873,31 μm^3 .

Os valores de pH, para os meios testados, foram também medidos , estando a sua variação traduzida na figura seguinte.

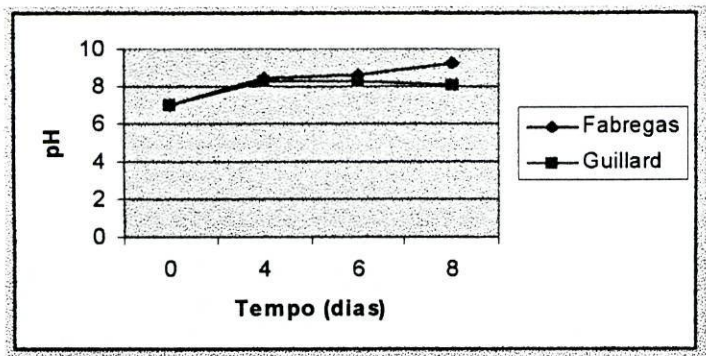


Figura 3.36. Variação do pH das culturas do *Flagelado* no meio de Fabregas e no meio de Guillard.

Como seria de esperar, os valores de pH das culturas aumentaram em meio de Fabregas e diminuíram em meio de Guillard.

Os nutrientes iniciais e os que restaram em cada meio, após 8 dias de cultura, foram analisados, depois das microalgas serem removidas por filtração com filtros da Whatman GF/C (duas passagens). Os resultados estão traduzidos na tabela 3.24, assim como a percentagem de remoção verificada para cada nutriente no final da experiência.

Tabela 3.24 Média das concentrações e respectivos desvios padrão (n=3) inicial (I) e final (F) dos nutrientes (mg/L) nos diferentes meios de cultura : amónia (N-NH₄), nitratos (N-NO₃), fosfatos (P-PO₄) .Remoção de nutrientes em percentagem.

Meios	Tempo	Amónia(mg/L)	Fosfatos(mg/L)	Nitratos(mg/L)
Fabregas	Inicial	0,02 ± 0,00	3,14 ± 0,00	28,24 ± 0,00
	Final	0,00 ± 0,03	0,00 ± 0,01	0,415 ± 0,00
	Remoção	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	99,36 ± 0,05
Guillard	Inicial	9,00 ± 0,00	1,16 ± 0,00	0,17 ± 0,00
	Final	0,00 ± 0,06	0,00 ± 0,0	0,01 ± 0,00
	Remoção	100 ± 0,05	100,00 ± 0,00	92,16 ± 0, 04

No meio de Fabregas verifica-se que a microalga remove praticamente todo o azoto existente sob a forma de nitratos.

No meio de Guillard o azoto sob a forma de amónia, (fonte de azoto usada) , é removido totalmente. O *Flagelado* remove a totalidade do azoto presente independentemente da sua origem.

Com esta microalga, não houve formação de amónia, como tinha acontecido com as microalgas utilizadas nos ensaios anteriores, ou se houve, esta desapareceu rapidamente do meio de cultura.

O fósforo, em ambos os meios, apresenta uma percentagem de remoção de 100%.

Embora esta microalga tenha utilizado bem o azoto, quer sob a forma de nitratos (meio de Fabregas) quer sob a forma amoniacal (meio de Guillard) conforme referido, os melhores resultados em termos de produção de biomassa, e de clorofila obtiveram-se com o meio de Fabregas. Atendendo a estes factores, o meio de referência seleccionado foi o meio de Fabregas.

CRESCIMENTO E REMOÇÃO DE NUTRIENTES PELO *FLAGELADO* CULTIVADO NO EFLUENTE PISCÍCOLA

Com este ensaio pretendeu-se avaliar a o crescimento e a capacidade de remoção dos compostos azotados e fosfatados do Efluente pelo *Flagelado*, numa perspectiva de utilização de espécies autóctones no tratamento e valorização de efluentes piscícolas. O Efluente utilizado foi a amostra procedente do mês de Setembro, em que a razão N:P era 10:1 , tendo-se efectuado uma correcção deste com amónia, adicionando-se ao meio 2,34 mg/L de cloreto de amónia (NH_4Cl) para se obter uma relação de N:P 20:1. Seguidamente, apresentam-se os resultados obtidos para os parâmetros avaliados ao longo do tempo experimental.

Na figura 3.37 apresenta-se a variação da densidade óptica obtida nos meios de cultura utilizados.

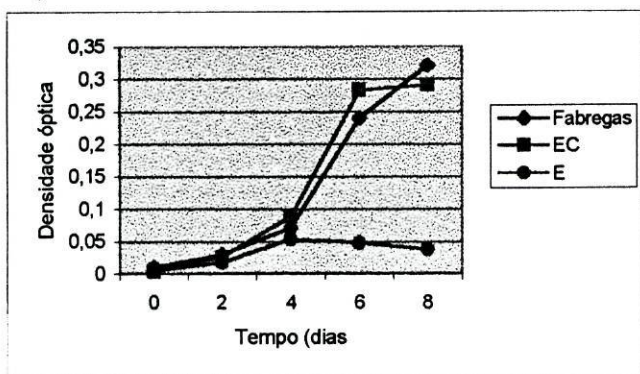


Figura 3.37- Variação da densidade óptica da cultura do *Flagelado* ao longo do tempo quando cultivado em três meios diferentes: meio de Fabregas ; Efluente com Correção (EC) e Efluente sem Correção (E).

Novamente se constata que o *Flagelado* não mostra problemas de adaptação aos meios, pois a densidade óptica aumentou logo nos primeiros dias.

A análise de variância, para $p < 0,05$ revelou diferenças significativas para a densidade óptica entre o meio de Fabregas e o Efluente sem Correção a partir do 6º dia. Contudo, é de notar que se as medições fossem efectuadas no 5º dia provavelmente já se teriam observado essas diferenças.

Entre o meio de Fabregas e o Efluente Com Correção não ocorrem diferenças significativas para os tempos analisados. Entre os efluente ocorrem diferenças significativas a partir do 6º dia , ou provavelmente já no 5º dia, como no caso anterior.

Os valores obtidos para a densidade celular observada nos três meios são apresentados na figura 3.38.

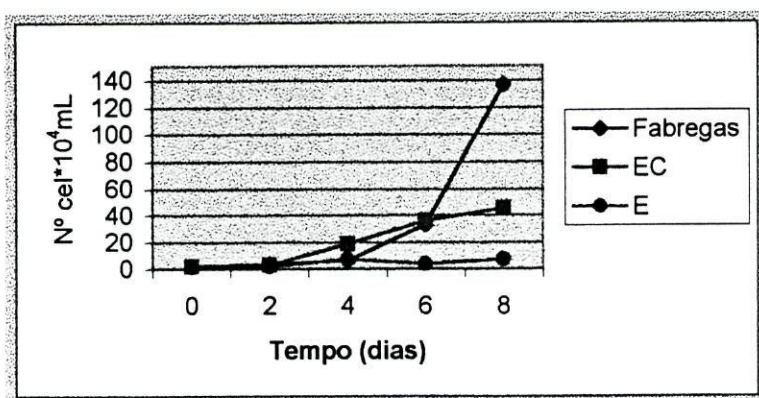
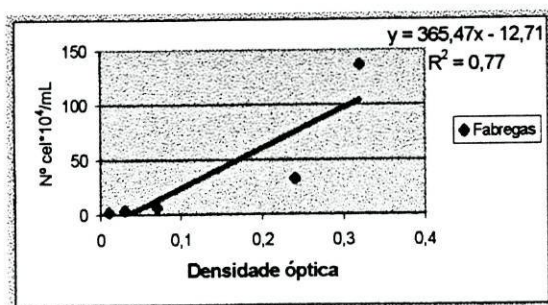


Figura 3.38. Variação da densidade celular do Flagelado, quando cultivado em três meios diferentes: meio de Fabregas , Efluente com Correção(EC) e Efluente sem Correção (E.), para 8 dias de cultura.

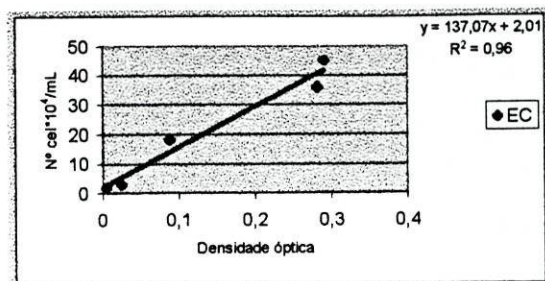
Os dados relativos à densidade celular evidenciam uma certa dificuldade no arranque para os três meios, rapidamente ultrapassada no Efluente com Correção, mas com crescimento posterior de menor intensidade e duração que em meio de Fabregas. No Efluente sem Correção a microalga apresentou sempre dificuldades de crescimento. A densidade celular máxima, observada em Fabregas foi de 146×10^4 cel/mL; no Efluente com Correção foi de 45×10^4 cel/mL, e no Efluente sem correção, 7×10^4 cel/mL.

A análise estatística efectuada (ANOVA, para $p < 0,05$) revelou diferenças significativas, relativamente à densidade celular, para a espécie em estudo, nos três meios de cultura a partir do 4º dia, inclusive. Entre os dois efluentes também ocorreram diferenças significativas já a partir do 2º.

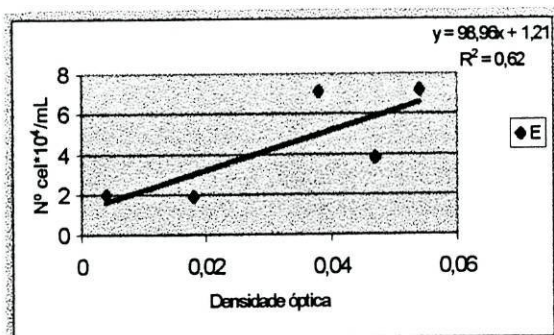
NA análise de regressão linear efectuada, entre os valores de densidade celular e de densidade óptica, os valores de R^2 (coeficiente de determinação) foram para o meio de Fabregas de 0,77, para o Efluente com Correção de 0,97 e para o Efluente sem Correção este valor foi de 0,62. Na figura 3.39 podem observar-se as respectivas rectas de regressão.



A- Fabregas



B- Efluente com Correção



C- Efluente sem Correção

Figura 3.39- Relação entre a densidade óptica e o número de células do *Flagelado* ao longo do tempo quando cultivada no meio de Fabregas(A), no Efluente com Correção (B) e no Efluente sem Correção (C).

Para este ensaio os registos correspondentes à taxa de crescimento (μ) e ao número de duplicações/ dia observada em cada um dos meios, apresentam-se na tabela 3.25.

Tabela 3.25 Valores da taxa de crescimento e do número de duplicações diárias obtidos com o *Flagelado* usando três meios diferentes.

Meios	Taxa de crescimento (μ)				Duplicações			
	2	4	6	8	2	4	6	8
Fabregas	0,29± 0,040	0,29± 0,01	0,81± 0,116	0,66± 0,03	0,06± 0,01	0,14± 0,02	0,17± 0,03	0,47± 0,03
Efluente C/ Correção	0,20± 0,00	0,84± 0,04	0,40± 0,03	0,11± 0,05	0,00± 0,00	0,49± 0,00	0,45± 0,02	0,08± 0,00
Efluente	0,00± 0,00	0,63± 0,00	0,00± 0,00	0,55± 0,03	0,00± 0,00	0,49 ± 0,01	0,45± 0,04	0,08± 0,01

No ultimo dia do ensaio foram avaliados, para os três meios utilizados, os pigmentos celulares (clorofila a e feopigmentos) e a biomassa (sólidos suspensos)

existentes no meio de cultura. Os resultados obtidos estão registados na tabela 3.26. A quantidade de **clorofila a** por célula está também registada na referida tabela.

Tabela 3.26 Biomassa seca, pigmentos celulares clorofila **a** / célula observada nos meios de cultura testados, com o *Flagelado*.

Meios	Biomassa (mg/L)		Pigmentos (mg/L)		Cla/cel (pg/cel)
	SST	SSV	Clorofila a	Feopigmento	
Fabregas	470,01 ± 14,14	270,25 ± 14,14	9,25 ± 0,06	0,232± 0,01	6,34±0,01
Efluente c/ Correcção	600,34 ± 24,14	370,53 ± 22,43	3,08 ±0,0 2	0,00±0,00	6,86±0,02
Efluente s/ Correcção	360,23 ± 6,23	180,26 ± 56,67	0,29±0,00	0,014± 00,00	1,96 ±0,02

Pode verificar-se que a maior produção de biomassa e de pigmentos por célula ocorre no Efluente com Correcção. Os valores mais baixos são observados no Efluente sem Correcção.

As **dimensões** e o **biovolume** obtidos no final do ensaio são ligeiramente superiores aos valores iniciais (8-10 x12-14 µm,) no meio de referência e no Efluente com Correcção. Assim, os valores finais observados (mínimo e máximo) foram de 10-12 x 14-16 (µm), para o meio de Fabregas e 8-10 x12-16 para o Efluente com Correcção. Como consequência da alteração das dimensões celulares, o biovolume observado foi de : no meio de Fabregas 732,66 e 1205,76 µm³ em (valores mínimos e máximos) e no Efluente com Correcção 401,92 e 837,33 µm³.

Os valores de pH, para os meios testados, foram também determinados , estando a sua variação traduzida na figura seguinte. Uma vez mais se observa a descida do pH nos últimos dias de cultura para os meios contendo amónia como fonte de azoto.

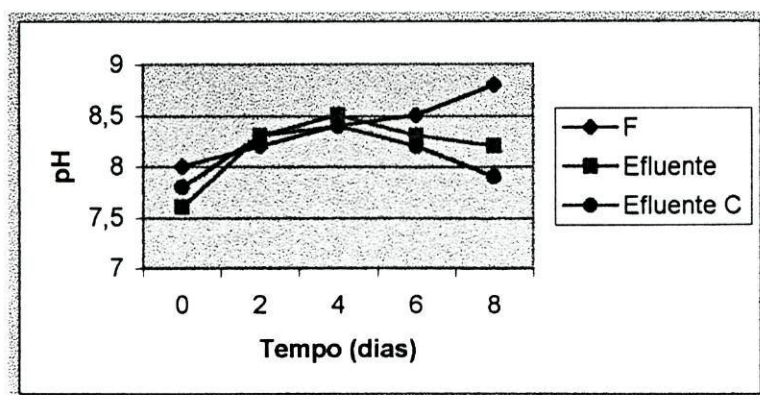


Figura 3.40- Variação temporal do pH das culturas no meio de Fabregas, Efluente com Correção e Efluente sem Correção para o *Flagelado*.

A salinidade variou entre 35 e 37‰ ao longo deste ensaio tendo-se sido feitas correcções, como nos ensaios anteriores, com água destilada autoclavada.

Os nutrientes que restaram em cada meio, após 8 dias de cultura, foram analisados depois da remoção das microalgas por filtração com um filtro Whatman GF/C . Os resultados estão traduzidos na tabela 3.27 , assim como a percentagem de remoção de cada nutriente e o valor inicial dos nutrientes em cada meio.

Tabela 3.27 Média das concentrações e respectivos desvios- padrão (n=3) inicial (I) e final (F) dos nutrientes (mg/) nos diferentes meios de cultura com o *Flagelado* amónia (N-NH₄), nitratos (N-NO₃), fosfatos (P-PO₄) .Remoção em percentagem.

Meios	Tempo	Amónia	Fosfatos	Nitratos
Fabregas	Inicial	0,01 ± 0,00	3,14 ± 0,00	28,24 ± 0,00
	Final	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,00
	Remoção	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	99,36 ± 0,00
Efluente C	Inicial	4,24 ± 0,03	0,50 ± 0,00	0,38 ± 0,00
	Final	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Remoção	100,00 ± 0,00	94,00 ± 0,00	100 ± 0,00
Efluente	Inicial	1,90 ± 0,10	0,50 ± 0,00	0,38 ± 0,00
	Final	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,13 ± 0,00
	Remoção	100,00 ± 0,00	97,47 ± 0,00	66,61 ± 0,00

Da análise da tabela pode concluir-se que a percentagem de remoção de amónia é igual no Efluente, com e sem Correção . Os fosfatos são removidos totalmente em meio de Fabregas. No Efluente, em ambas as situações, o valor de remoção é ligeiramente inferior à do meio de Fabregas, sendo a remoção mais baixa observada no Efluente com Correção.

A remoção dos nitratos por parte desta microalga foi semelhante em Fabregas e no Efluente com Correção próxima dos 100%, e na ordem dos 66% no Efluente sem Correção.

Esta microalga efectuou uma boa remoção de nutrientes nos três meios, especialmente no Efluente com Correção.

4. DISCUSSÃO

Embora o presente estudo tenha sido baseado no efluente de três tanques de cultura de Pregado em regime intensivo, alguns dos resultados obtidos são passíveis de uma análise comparativa com trabalhos realizados, por exemplo, por SHIREMAN *et al.*, (1994) LEFBVRE *et al.*, (1996); HUSSENOT *et al.*, (1996, 1998, 2000); LEMARIÉ *et al.*, (1998) e TOVAR *et al.*, (2000), com efluentes de pisciculturas marinhas em regime semi-intensivo e intensivo. Relativamente aos ensaios realizados com as microalgas é possível, para alguns parâmetros fazer uma comparação com os trabalhos realizados, por exemplo, por MOREIRA (1996), CRAGGS *et al.*, (1997); HUSSENOT *et al.*, (1998);

4.1. Caracterização da Piscicultura

A dispersão de resultados verificados neste estudo não é de estranhar atendendo à acumulação de factores de variação que intervêm no funcionamento desta piscicultura, nomeadamente factores humanos (como manutenção e distribuição do alimento, tipo de bombas seleccionadas), factores zootécnicos (densidade dos animais, calibração) e factores ambientais (disponibilidade de oxigénio, temperatura, salinidade e regime hidráulico). Assim, os resultados obtidos podem considerar-se como característicos da piscicultura em estudo, mais concretamente dos tanques o que dificulta a comparação com dados de outros trabalhos. No entanto procurar-se à fazer uma análise comparativa relativamente aos parâmetros possíveis, apesar dos condicionalismos referidos.

4.1.1 CARACTERIZAÇÃO DOS TANQUES EM ESTUDO

TEMPERATURA E OXIGÉNIO

A temperatura óptima indicada para o Pregado, na fase de engorda, embora não exista na literatura um valor definido, localiza-se próximo dos 20°C (BARNABÉ, 1990). O mesmo autor refere que o animal deixa de se alimentar a temperaturas

compreendidas entre 5 e 6ª e acima de 23°C. Os valores observados na piscicultura amostrada (mínimo 11,8 °C em Janeiro e máximo 17,3 °C em Maio), não estão muito longe dos valores considerados óptimos para a espécie. Por outro lado, constata-se que as temperaturas mais baixas observadas, além de ocorrerem no Inverno ocorrem também nos meses em que a percentagem provável de água recirculada é das mais baixas. Logo, a entrada directa de água do mar leva a uma diminuição da temperatura da água da piscicultura.

Os valores de oxigénio foram instáveis ao longo do período experimental (por exemplo 4,5 ppm em Abril e 13,9 ppm em Setembro), mas foram sempre superiores aos valores considerados mínimos para a espécie (3ppm - 5ppm) (PERSON- LE-RUYET, 1992). A instabilidade observada poderá contribuir para situações de stress, que se poderão reflectir no crescimento e taxas de excreção.

BIOMASSA, CARGAS E NÚMERO DE ANIMAIS

O Pregado, durante a fase de engorda pode suportar cargas compreendidas entre 75 e 125 Kg/m³ (PERSON- LE RUYET, 1992), no entanto, normalmente as cargas usadas variam entre 25-50 Kg/m³. Nos tanques em estudo os valores observados estão dentro do intervalo suportável por esta espécie, havendo sempre a preocupação de se efectuarem a calibrações como se constatou nos resultados obtidos (figura 3.6), em que por exemplo no mês de Agosto as cargas eram de 84,27 Kg/m³ e no mês de Setembro já diminuíram para 62,80 Kg/m³.

pH

O pH registado está dentro do pH óptimo de crescimento para esta espécie, pois o crescimento cessa com valores de pH inferiores a 7 (BAUTISTA,1991), o que nunca se verificou no estudo realizado .

SALINIDADE

Relativamente à salinidade os valores determinados estão dentro do intervalo normal considerado para esta espécie, que está entre 32 -35 ‰ (BAUTISTA, 1991).

4.1.1- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA DA PISCICULTURA

Como já se referiu anteriormente, o regime hidráulico é um dos factores mais importantes a ter em consideração aquando da caracterização do efluente produzido. A concentração dos nutrientes detectados no efluente está dependente não só dos factores directamente relacionados com os animais, mas também com o regime em que a piscicultura se encontrava no momento em que foi efectuada a amostragem, em cada um dos meses considerados. De acordo com os dados recolhidos o regime hidráulico apresenta três situações possíveis : regime aberto, semi - fechado e fechado, embora seja a situação de regime semi- fechado a que é mais frequente.

ÁGUA DE ENTRADA NO RESERVATÓRIO

A caracterização efectuada a esta amostra indica-nos que a água que entra na piscicultura, nem sempre é só água do mar. A sua composição depende mais uma vez do sistema ou regime em que a piscicultura se encontrava quando foi efectuada a amostragem, bombagem com a bomba de 200L/s de capacidade ou com bomba de 50L/s, auxiliada pelas bombas de recirculação.

Por outro lado, através de informação pessoal do biólogo responsável, soubemos, que por vezes ocorrem situações de refluxo de água recirculada para o tubo de entrada da água do mar no reservatório, atendendo a que a posição de entrada do tubo que transporta água recirculada é superior à do que transporta água do mar. Daí que, quando a água do mar não tem pressão suficiente, podem ocorrer situações de refluxo de águas o que leva a mistura, e o que se esperava ser só água do mar pode ser já água de mistura, em grau variável e difícil de quantificar.

Assim, a água de entrada na piscicultura apresentou uma composição variável, como se constatou nos resultados apresentados na tabela 3.4, especialmente nos valores da concentração de amónia, que atingiu o valor mais elevado no mês de Junho (1,71

mg/L), quando a piscicultura estava a funcionar em sistema fechado. Em regime semi - fechado o valor mais elevado foi determinado em Agosto (0,16 mg/L).

No mês em que se considerou que a piscicultura estava em regime aberto, os valores apresentados para os parâmetros avaliados estão de acordo, como se referiu, com os valores indicados por AMINOT & CHAUSSEPIED (1983) para águas costeiras. Salienta-se que relativamente aos nitratos os valores são ligeiramente mais elevados, e poderão estar associados à zona de agricultura intensiva em que a piscicultura está implantada.

ÁGUA DE ENTRADA NO CONJUNTO DE TRÊS TANQUES ESTUDADOS

A água de entrada nos tanques nos tanques de engorda em geral é caracterizada por ser sempre ou quase sempre água recirculada, pelo que transporta já uma certa carga de nutrientes. Sendo assim, a sua composição variou ao longo do período experimental como consequência da percentagem de mistura de água recirculada e de água do mar como se apresentou na tabela 3.5.

A amónia é o composto que mais se evidencia em todas as amostras, como era de esperar em efluentes deste tipo, que se caracterizam por um aumento da concentração de azoto amoniacal, assim como de fósforo dissolvido, relativamente à composição da água do mar da zona de implantação da piscicultura (LEMARIÉ *et al.*, 1998).

EFLUENTE DE SAÍDA DOS TANQUES AMOSTRADOS

A produção de nutrientes manifestou-se através do aumento da concentração de azoto amoniacal e de fosfatos em quase todos os meses, relativamente à água de entrada. A produção destes está associada quer ao alimento distribuído, quer à fisiologia da espécie. A concentração máxima de amónia, (4,9 mg/L), observada em Junho é ligeiramente superior aos valores encontrados por outros autores em efluentes deste tipo (LEFEBVRE *et al.*, 1996; HUSSENOT *et al.*, 1998; TOVAR *et al.*, 2000). Os valores de fosfatos (máximo de 0,66 mg/L) em Junho são também elevados. No

entanto, convém referir que os valores mais elevados foram observados quando a piscicultura estava a funcionar em circuito fechado, o que não é a situação mais comum nessa unidade. Nos restantes meses os valores observados estão dentro dos apresentados pelos autores acima citados, por exemplo 0,75 mg/L para a amónia e 0,25 mg/L para os fosfatos (HUSSENOT *et al.*, 1998).

A provável produção diária de material azotado dissolvido teve como mínimo, o valor observado em Janeiro (40,78 Kg/ dia), sendo o valor máximo observado em Junho (1173 Kg / dia). A produção de fósforo teve como valor máximo 145,89 Kg / dia em Fevereiro.

A produção de nitritos e nitratos observada em alguns meses está provavelmente relacionada com o tempo de residência da água nos tanques (LEMARIÉ *et al.*, 1998), a taxa de recirculação e a temperatura. Assim, quando os valores de amónia são muito elevados (e consequentemente, também o serão os de ureia, que embora não tenham sido doseados são um produto de excreção azotada importante no Pregado), as bactérias nitrificantes transformam a amónia e a ureia em nitritos e estes depois em nitratos. No mês de Junho, mês em que a piscicultura estava em sistema fechado, a taxa de recirculação foi elevada, e a não ocorrência da produção de nitritos e o aumento da produção de nitratos poderá estar associado a acção das bactérias existentes no efluente.

Os valores da razão N:P observados foram muito diferentes em todas as amostragens, como consequência das variações da concentração dos respectivos nutrientes. No entanto, os valores obtidos em Maio (15:1), Junho (18:1) e Novembro (14:1) são valores próximos dos existentes em alguns meios de cultura, nomeadamente o meio de FABREGAS *et al.* (1984) e de Guillard (1975).

Embora a produção de amónia seja directa e positivamente influenciada pela temperatura da água (CLARK *et al.*, 1983 *in* Tetu) no estudo realizado não foi possível observar essa relação, atendendo a que, além da temperatura da água, variaram também em cada amostragem realizada o número de peixes, as cargas dos tanques, assim como o regime hidráulico.

Os dados obtidos não permitiram evidenciar a relação linear que se sabe existir

entre o azoto ingerido e o excretado (é importante salientar-se que apenas a amónia foi determinada) e o peso médio dos peixes, o que não está de acordo com outros trabalhos realizados, em que se evidencia essa relação nomeadamente em trabalhos realizados por KAUSIK (1980), KIKUCHI *et al.* (1991) e por DOSDAT (1994). Este último autor em experiências realizadas com peixes de pesos diferentes (10 g e 100 g) à temperatura de 16°C, viu que se excretavam respectivamente 254 mg N /KG peso fresco/dia e 120 mg P/KG peso fresco/dia. Trabalhos mais recentes (LEMARIÉ *et al.*,1998) confirmam a relação existente entre o peso médio do peixe e o azoto e fósforo excretado, sendo que a concentração dos dejectos de azoto e fósforo expressos em mg/Kg de peso fresco por dia, é inversamente proporcional ao peso do peixe. Para uma alimentação similar também se disse que a produção de resíduos na forma de azoto e fósforo depende da espécie, do peso médio e da temperatura.

LEMARIÉ *et al.* observaram também que em peixes com peso entre com 25 e 365g, a uma temperatura de 17°C a produção diária total de azoto é de 582,7 a 307,8 mg N/Kg de peixe fresco e o fósforo total é de 49,6 a 22,6 mg P/Kg de peixe fresco.

No estudo experimental por nós realizado, embora o tamanho dos peixes utilizados, fosse bastante superior aos referidos por DOSDAT *et al.* (1994) e por LEMARIÉ *et al.* (1998), a variabilidade de condições não permitiu a observação desta relação como referido, para além de que não era possível saber com precisão a quantidade de alimento utilizado pelos peixes.

SÓLIDOS SUSPENSOS

Os valores mais elevados de sólidos foram obtidos em Agosto, o que está de acordo com os trabalhos apresentados por TOVAR *et al.* (2000) que referem serem os Sólidos Suspensos um dos problemas ambientais mais importantes relacionados com a aquacultura, e que os valores máximos de sólidos ocorrem no verão quando a actividade, o alimento e o crescimento dos animais são mais elevados.

Por outro lado, os dados obtidos também contribuem para apoiar a constatação de um dos problemas relativos à piscicultura estudada que ocorre, quer devido às marés vivas características da zona em que a piscicultura está localizada, quer à falta

de um decantador para a água de entrada, o excesso de areia na água bombeada do mar.

A produção de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) é no Efluente sempre superior aos valores obtidos para as outras amostras, estando estes resultados de acordo com a bibliografia referida. O valor mais elevado registou-se na colheita efectuada em Agosto. A não produção, em Junho, de S.S.V. poderá estar associada ao funcionamento em circuito fechado, à temperatura e à carga bacteriana existente na água recirculada na amostra desse mês. Esta, segundo a Dr.^a Teresa Carvalho (contacto pessoal, trabalho em publicação) era muito elevada. Assim, provavelmente, deve ter ocorrido a decomposição de matéria orgânica em amónia, e nitratos, o que contribuiu, também, para o aumento da concentração destes nutrientes no meio, conforme se referiu anteriormente.

Os valores de matéria orgânica obtidos no mês de Agosto foram muito elevados em relação aos outros meses como consta da figura 3.15. Tal poderá ter sido o resultado por um lado, do excesso de alimento que fica nos tanques e que está de acordo com a bibliografia consultada, e por outro, consequência do processo de desinfecção da piscicultura que pode ter ocorrido poucos dias antes da colheita, segundo informações recolhidas no local, e que terá alterado a flora bacteriana. Esta suposição é apoiada pela verificação de uma diminuição da carga bacteriana segundo a Dr.^a Teresa Carvalho (contacto pessoal) daí a não decomposição total da matéria orgânica e a obtenção de valores muito elevados de sólidos voláteis nesta amostra.

CLOROFILA A

Os resultados obtidos indicam-nos que não há produção de fitoplâncton dentro dos tanques de engorda. A não ocorrência de fitoplâncton poderá ser explicada pelo facto de a água de entrada não ser geralmente só água do mar, logo, ser deficiente em inóculo natural e em factores de crescimento (metais traço e/ou vitaminas) e também pelo estado de penumbra em que os tanques se encontram. Trabalhos similares realizados por LEMARIÉ *et al.* (1999) também se caracterizaram pela ausência de fitoplâncton neste tipo de efluentes.

Apesar de os dados por nós obtidos não corresponderem ao efluente total da piscicultura, mas sim a uma pequena parte deste, pese embora o facto de o regime hidráulico mais comum na piscicultura ser um regime semi - fechado, consideramos útil fazer uma comparação, sempre com carácter aproximado entre os valores obtidos neste estudo e os valores disponíveis na legislação portuguesa relativamente às características de águas do litoral ou salobras para fins aquícolas- águas conquícolas (Decreto Lei n.º 236/98 de 8 de Agosto, anexo XIII e XV). Os dados oexistentes podem ser observados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 Valores de referência na legislação para a qualidade das águas do litoral para fins aquícolas e conquícolas e os valores obtidos no efluente piscícola estudado.

Variáveis	Valores de referência ¹	Valores de referência ²	Valores máximo no efluente	Valores médios no efluente
pH	7- 9	6-9	8	7-8
Sólidos suspensos (mg/L)	Inferior a 30% do existente	93,8	275	100
N-NH ₄ (mg/L)	Não é referido	(3)	4,96 mg/L	1,79
N-NO ₂ (mg/L)	Não é referido	(3)	0,21 mg/L	0, 14mg/L
N-NO ₃ (mg/L)	Não é referido	(3)	0,61 mg/L	0, 45 mg/L

1. Valores para a Qualidade das águas do litoral ou salobras para fins aquícolas- águas conquícolas;
2. Valores para qualidade das águas balneares
3.Estes parâmetros devem ser verificados pelas autoridades competentes sempre que haja tendência para a eutrofização das águas.

Os valores médios dos sólidos no efluente (100 mg/L) são muito próximos dos valores médios obtidos para a água do mar (98 mg/L) que abastece a piscicultura, pelo que não excedem os 30% considerados no Decreto Lei referido.

O pH está dentro dos valores de referência. Quanto aos outros parâmetros, não se podem extrair conclusões atendendo à falta de elementos no referido Decreto Lei.

4.2. Ensaaios realizados com Microalgas

A principal variável considerada nas experiências efectuadas foi a composição qualitativa e quantitativa dos meios de cultura utilizados (Fabregas, Guillard e Efluente com Correção e sem Correção), especialmente no que respeita à fonte de azoto, que segundo vários autores (ANTIA *et al.*, 1975; GOLDMAN & PEAVEY, 1979; OJEDA & AFONSO, 1986; FABREGAS *et al.*, 1989) influencia a cinética de crescimento das microalgas.

Como já foi referido, no meio de FABREGAS a fonte de azoto são os nitratos, em GUILLARD a fonte é a amónia e no Efluente a fonte de azoto é constituída por nitratos e amónia em simultâneo.

Em todos os ensaios realizados neste trabalho, se verificou a ocorrência de algumas variações na intensidade de luz, variações essas que poderão ter afectado a velocidade de crescimento e a densidade celular, especialmente esta última (LOPEZ-MUNOZ *et al.*, 1990) .

Apesar de não se conseguir estabelecer uma comparação directa entre os resultados obtidos e a literatura existente sobre este assunto, devido às condições experimentais serem diferentes, dever-se à referir que várias experiências têm sido realizadas com efluentes piscícolas, obtendo-se também resultados satisfatórios (DE PAW e VAERENBERG, 1981; MOZES e GORDIN, 1991; SPHIGEL *et al.*, 1993; LEFEBVRE *et al.*, 1996; MOREIRA, 1996; HUSSENOT *et al.*, 1998; CRAGS, 1998).

Quando o Efluente foi utilizado como meio de cultura, procurou-se corrigir, no caso de *P. tricornutum* a razão N:P:Si, e nos restantes a razão N:P, com o objectivo de obter a máxima produção microalgal e, logo, a máxima capacidade de depuração . Esta prática foi utilizada por diversos autores como DUNSTAN e TENORE (1972), GOLDMAN, (1976), FAVERIS e LUBET(1978), LEFEBVRE *et al.* (1996); MOREIRA (1996) e HUSSENOT *et al.*(1998).

Foi ainda possível observar em quase todos os ensaios a existência de proporcionalidade directa entre o número de células e a densidade óptica (DO), o que indica poder ser este parâmetro um bom indicador do crescimento. Assim, a vantagem da utilização da densidade óptica reside na rapidez do processo, sendo utilizada por vários autores (BORGES, 1984; GONZALES-RODRIGUES e MAESTRINI, 1984; HERRERO e FABREGAS, 1985; CID *et al*, 1992a, 1992 b; MOREIRA, 1996; HUSSENOT E LEFEBVRE, 1998).

Também é de referir que com as microalgas *P. tricornutum* e *T. suecica* ocorreu a formação de amónia no meio de Fabregas, possivelmente devido à acção bacteriana .

Devido à especificidade de cada microalga os resultados obtidos serão analisados por espécie utilizada.

4.2.1. ENSAIOS COM *Phaeodactyllum tricornutum*

SELECÇÃO DO MEIO DE REFERÊNCIA

Através da análise das figuras 3.18 e 3.19, verifica-se que a espécie ensaiada cresceu sem problemas no que respeita à densidade celular e à densidade óptica, quer no meio de Fabregas., quer no meio de Guillard, não se observando fase de latência.

A densidade celular máxima obtida no meio de Fabregas foi de 985×10^4 cel/mL, sendo este valor mais baixo que o obtido por MOREIRA (1996), ao 8º dia, nas mesmas condições experimentais (embora o volume utilizado fosse só de 800 mL). Contudo, trata-se de uma espécie com origem diferente, o que poderá levar a comportamentos de crescimento não idênticos.

O valor obtido em meio Guillard foi bastante mais baixo (247×10^4 cel/mL) e, muito distante de valores obtidos com *P. tricornutum* em trabalhos realizados por MOREAU *et al*. (1998).

Analisando a figura 3.20 (A e B) pode inferir-se da existência de proporcionalidade directa entre o número de células e a densidade óptica (DO), conforme referido anteriormente .

Uma análise mais detalhada dos resultados permite verificar que o crescimento em número de células foi ligeiramente superior no meio de Guillard relativamente ao meio de Fabregas nos primeiros quatro dias de cultura possivelmente devido a que a fonte de azoto disponível, azoto amoniacal, ser assimilada mais rapidamente que o nitrato, fonte de azoto em Fabregas. Com efeito, sabe-se que a incorporação de nitrato implica dispêndio de energia, para ser reduzido a amónia e posteriormente utilizado, enquanto que a amónia é incorporada directamente nas moléculas orgânicas (BERTL *et al.*, 1984; ULRICH *et al.*, 1984). No entanto, o maior número de células foi obtido no meio rico em nitratos, o que concorda com FIDALGO *et al.* (1990).

Os valores mínimos e máximos da taxa de crescimento obtidos no meio de Fabregas são semelhantes aos obtidos por MOREIRA (1996) e HUSSENOT, (1998) em condições de cultura análogas.

A variação do pH observada está de acordo com o que era esperado, pois no meio em que os nitratos são a fonte de azoto (meio de Fabregas), o pH aumentou e segundo BREWWER e GOLDMAN (1976) a assimilação do nitrato faz efectivamente aumentar o pH. No meio em que a amónia é a fonte de azoto (Guillard,) o pH diminuiu, o que está de acordo com a bibliografia consultada, que diz que quando se utiliza amónia como única fonte de azoto, a incorporação desta pelas microalgas é acompanhada por uma produção de iões H^+ , provocando uma descida no pH do meio (ULRICH *et al.*, 1984).

A biomassa foi superior em meio de Fabregas relativamente ao meio de Guillard, o que será lógico, na medida em que este foi o meio que mais promoveu o crescimento da microalga *P. tricornutum*.

A produção de clorofila foi também superior em meio de Fabregas (7,28 mg/L contra 0,3 mg/L em meio de Guillard). No entanto, os valores encontrados em meio de Fabregas são ligeiramente inferiores aos obtidos por MOREIRA (1996) e por HERRERO (1991), em meios de cultura cuja fonte de azoto eram os nitratos.

As dimensões determinadas para esta microalga (8-12µm de diâmetro por 20 - 24 µm de comprimento) são ligeiramente superiores às das indicadas por VEGA (1998), que são de 4-5 por 24-29 (µm). O biovolume encontrado foi 334,73 µm³, (valor mínimo) e 904,32 µm³, (valor máximo). Os parâmetros referidos não sofreram alterações ao longo do período experimental, em nenhuma das situações consideradas. No entanto, segundo FABREGAS *et al.*, (1985b) o biovolume é influenciado pela quantidade de nutrientes existentes no meio de cultura, aumentando progressivamente à medida que aumenta a quantidade de nitratos. Logo, seria de esperar um aumento deste pelo menos no meio de Fabregas. Por outro lado, o tempo de cultura (8 dias) pode não ter sido suficiente para provocar alterações nos parâmetros referidos.

A percentagem de remoção de azoto e fósforo por parte desta alga foi boa em ambos os meios. A remoção de fosfatos foi ligeiramente superior no meio de Fabregas, relativamente ao meio de Guillard. A remoção de azoto foi sempre superior a 90% (tabela 3.11) independentemente da fonte de azoto ser a amónia ou os nitratos, o que permite considerar a sua utilização no tratamento de efluentes ricos nesses nutrientes. No entanto, a remoção máxima, de todos os nutrientes, foi conseguida com a razão N:P mais elevada, 20:1.

Como se pôde observar na tabela 3.11, verificou-se a produção de amónia no meio de Fabregas. Uma das hipóteses explicativas desta ocorrência será a existência de fenómenos de amonificação da matéria orgânica (células mortas), que entretanto se pode ter acumulado na cultura.

Os resultados obtidos neste ensaio são conclusivos, na medida em que se atingiu o objectivo proposto, a selecção de um meio de referência. Assim, o meio de Fabregas será o mais indicado para trabalhar com esta espécie.

ENSAIOS COM O EFLUENTE

Os valores dos parâmetros de crescimento obtidos com o meio de Fabregas neste ensaio são superiores aos do anterior, provavelmente como consequência do factor intensidade luminosa, que entretanto foi aumentada. Assim, a densidade celular máxima obtida foi de 1560×10^4 cel./ mL, isto é um aumento de 60% relativamente ao ensaio anterior, sendo próxima à de MOREIRA (1996), por exemplo, sem adição de silício para o mesmo tempo de cultura. Assim, pode concluir-se que o silício será menos importante que a intensidade luminosa para o desenvolvimento desta microalga.

A existência de proporcionalidade directa entre a densidade celular e a densidade óptica também foi observada neste ensaio como se pode constatar na figura 3.24..

Apesar da espécie não ter mostrado inicialmente dificuldades de adaptação ao Efluente piscícola, a densidade celular obtida nos meios de cultura (figura 3.23) Efluente com Correção e sem Correção, foram, desde o 2º dia de experiência significativamente inferiores às obtidas com o meio de Referência, tendo-se chegado a valores finais inferiores a 3% do máximo obtido.

No meio Efluente a microalga atingiu a fase estacionária a partir do 6º dia de cultura enquanto que no meio de Referência ainda se encontrava em fase exponencial ($\mu > 0,1$, segundo FERNANDEZ- REIRIZ *et al.* 1989) nesse dia.

Devido à semelhança de resultados de crescimento obtidos com e sem correção do Efluente em silício, pensa-se ser este nutriente dispensável em trabalhos posteriores.

Relativamente à biomassa e à clorofila, verifica-se que nos meios Efluente com correcção e sem Correcção, o valor destes parâmetros é inferior ao obtido no meio de Fabregas (tabela 3.20). Como se sabe, deficiências em ferro, azoto e magnésio inibem a síntese e acumulação de clorofilas (ABALDE *et al.*, 1995). No estudo realizado não foram efectuadas determinações quanto à composição do Efluente em relação aos micronutrientes, daí, que os valores de clorofila obtidos possam ser resultantes de deficiências nestes elementos. Por outro lado, apenas se determinou a clorofila a e, *P. tricornutum*, além deste pigmento apresenta também na sua composição clorofila c, carotenos e fucoxantina.

A biomassa, como é obvio, é mais elevada em meio de Fabregas, pois se o crescimento é superior ao do Efluente, também a biomassa final obtida será mais elevada.

Embora o crescimento da microalga não fosse muito elevado no Efluente com Correcção e sem Correcção, a remoção de nutrientes (tabela 3.14), foi boa, especialmente no Efluente Corrigido, em que o azoto, sob a forma de amónia e de nitratos foi removido na ordem dos 90%. Segundo BIENFANG (1975), quando há deficiências de azoto, a amónia e os nitratos podem ser utilizados em simultâneo, daí que a percentagem de remoção de ambos tenha sido boa. De notar que a remoção de fosfatos foi ligeiramente superior no Efluente Com e sem Correcção relativamente ao meio de Fabregas.

Os valores de remoção de amónia e fosfatos obtidos por esta espécie são semelhantes aos encontrados nos trabalhos realizados por CRAGGS *et al.* (1997) com *P. tricornutum* isolada da Baía de St Andrews.

Do mesmo modo que para no ensaio anterior com esta microalga ocorreu novamente a produção de amónia em meio de Fabregas. Assim, provavelmente, como referido a acumulação de matéria orgânica e a amonificação desta, por acção bacteriana terão levado à produção deste composto.

Embora esta microalga não cresça muito no Efluente, realiza um dos objectivos pretendidos, a remoção de nutrientes do meio, que como já se referiu foi boa (>90%), especialmente no Efluente com Correção de sílica (N :P : Si de 18:1:5).

4.2.2. ENSAIOS COM *Tetraselmis suecica*

SELECÇÃO DO MEIO DE REFERÊNCIA

Esta espécie também apresentou boa adaptação aos meios de cultura utilizados. A partir do quarto dia de cultura os valores da densidade celular em meio de Fabregas foram estatisticamente mais elevados do que em meio de Guillard. O desenvolvimento desta espécie foi superior no meio com nitratos, atingindo-se uma densidade celular máxima de 138×10^4 cel/mL no final da experiência, relativamente a apenas 20×10^4 cel /mL usando amónia como fonte de azoto. A fase estacionária é atingida mais rapidamente em Guillard (6º dia) do que em Fabregas (8º dia). Contudo, os valores finais observados no meio de Fabregas foram ligeiramente inferiores aos obtidos por FABREGAS *et al* (1985) e semelhantes aos obtidos por MOREIRA (1996). Deve-se, no entanto chamar-se novamente a atenção para a origem diferente da espécie, uma autóctone da Galiza no caso dos autores referidos e outra da algoteca do IPIMAR (Lisboa) e utilizada neste trabalho.

A proporcionalidade entre densidade óptica e densidade celular foi novamente observada, obtendo-se um valor de R^2 em ambas as situações superior a 0,94 (figura 3.28).

Os valores de clorofila *a* obtidos neste ensaio são semelhantes aos obtidos por FABREGAS *et al.* (1985), HERRERO *et al.*(1991) e MOREIRA (1996).

As dimensões e, consequentemente, o biovolume apresentados por esta microalga não sofreram alterações durante o ensaio realizado. Do mesmo modo que para a

microalga utilizada no ensaio anterior, *P. tricornutum*, a estabilidade nestes dois parâmetros poderá estar associado ao tempo de cultura utilizado.

Relativamente ao pH, embora só se tenha podido determinar este parâmetro no último dia de cultivo, constatamos que este é mais elevado em meio de Fabregas (8-9) do que em GUILLARD (7-9) o que está de acordo com trabalhos realizados por outros autores com esta microalga (SPECTOROVA *et al*, 1982; FABREGAS *et al.*, 1989, LOURENÇO *et al.*, 1997).

A percentagem de remoção de azoto e fósforo por parte desta alga foi boa em ambos os meios. A remoção de azoto foi sempre superior a 90% (tabela 3.17) independentemente da fonte de azoto ser a amónia ou o nitrato. A literatura consultada refere que as exigências nutricionais de *T. suecica* não são grandes, podendo esta utilizar amónia ou nitratos como fonte de azoto (FIDALGO, 1990; OTERO, 1994), embora exista uma preferência por nitratos.

A remoção do fósforo foi da ordem dos 100%, quer em meio de Fabregas, quer em meio de Guillard. Embora a remoção de azoto, fosse praticamente igual, nos dois meios utilizados independentemente da origem, o maior número de células foi obtido em Fabregas, pelo que este meio deverá ser seleccionado como meio de Referência para trabalhos com esta microalga.

ENSAIOS COM O EFLUENTE

Os registos de densidade óptica e da densidade celular obtidos com os três meios ensaiados revelam que nos primeiros dias esta microalga teve algumas dificuldades de arranque, mesmo meio de Referência (3.29 e 3.30). Esta dificuldade poderá ter sido devida a problemas técnicos decorridos durante o ensaio relacionados com a intensidade da luz, sendo evidente a recuperação do crescimento microalgal após a sua resolução. Contudo, no Efluente com Correção e sem Correção, um ligeiro

aumento do crescimento foi observado apenas a partir do 6º dia, sendo os valores obtidos sempre inferiores aos do meio de Referência. No final da experiência, estes representavam apenas 21% da densidade celular obtida em meio de Fabregas.

Neste ensaio a proporcionalidade entre os parâmetros de avaliação do crescimento, densidade óptica e densidade celular (figura 3.31), foi ótima para o meio de Referência, razoável para o Efluente sem Correção e mais baixa para o Efluente com Correção. Sendo assim, a densidade óptica pode ser usada para avaliação rápida da biomassa das culturas.

O comportamento da microalga foi irregular ao longo do ensaio, especialmente no Efluente, com variações acentuadas na taxa de crescimento e nas duplicações por dia (tabela 3.13) possivelmente como consequência das condições iniciais de cultura terem sido deficientes.

Os valores de clorofila *a* produzidos no Efluente foram muito inferiores aos produzidos no meio de Referência, sendo mais baixo no Efluente sem Correção do que no Efluente com Correção. A diferença observada poderá estar associada à deficiência em azoto e em micronutrientes, como referido anteriormente.

Neste ensaio ocorreu variação e nas dimensões da microalga em estudo e logo, nos valores de biovolume. Assim, constatou-se que o biovolume foi superior no meio de Fabregas relativamente aos Efluentes, o que está de acordo com a bibliografia consultada que diz que à medida que o nitrato existente no meio diminui, o biovolume também diminui (FABREGAS *et al.*, 1985 b). Por outro lado, o valor mais baixo observa-se no Efluente sem Correção, que é o meio onde a microalga se encontra em fase de crescimento estacionária. Logo, estes resultados estão de acordo com FERNANDEZ- REIRIZ (1989) que refere que o tamanho das células de *T. suecica* diminui na fase estacionária.

A assimilação dos nutrientes por parte desta espécie no Efluente com Correção e sem Correção foi inferior à que se constatou no meio de Referência (tabela 3.16),

especialmente a remoção de fosfatos e a remoção de nitratos no Efluente sem Correção. Embora se tenha efectuada uma correcção da razão N:P para que esta fosse próxima da do meio de Referência, esta correcção foi efectuada com amónia, por razões já apontadas anteriormente. Mas as concentrações iniciais de nutrientes no meio de Referência e no Efluente eram muito diferentes. Ora, esta microalga, embora possa utilizar quer nitratos quer amónia, mostrou preferência por um meio rico em nitratos, pelo seu crescimento superior nestas condições. No Efluente piscícola o comportamento da microalga foi instável, devendo este aspecto ser objecto de estudos mais aprofundados posteriormente.

4.2.3. ENSAIOS COM O *FLAGELADO*

SELECÇÃO DO MEIO DE REFERÊNCIA

A espécie autóctone designada por *Flagelado* parece não apresentar problemas de adaptação aos meios, pois constatou-se um bom arranque quer no meio rico em nitratos (Fabregas) quer no meio rico em amónia (Guillard) como se pode constatar nas figuras 3.33 e 3.34.

A análise estatística efectuada revelou diferenças significativas entre os dois meios para a densidade óptica, somente a partir do 6º dia, enquanto que para a densidade celular foi a partir do 2º dia. Esta não concordância de tempos para os dois parâmetros avaliados comprova-se na baixa proporcionalidade observada entre estes dois factores para o meio de Guillard. Segundo BROSSARD e HUSSENOT (1997) para que se verifique correlação entre a densidade óptica e a densidade celular é necessário que a relação entre a produção de clorofila *a* e o crescimento celular seja constante ao longo da curva de crescimento, o que pode não ter acontecido neste caso.

A taxa de crescimento observada foi instável em ambos os meios, sendo, contudo, os valores mais elevados obtidos em Fabregas.

As dimensões e o biovolume observados mantiveram-se constantes, como se verificou com as espécies utilizadas nos ensaios anteriores, nas mesmas condições.

Relativamente ao pH, o comportamento observado foi semelhante ao que se verificou nos outros ensaios e está de acordo com a bibliografia consultada.

A remoção de nutrientes foi semelhante em ambos os meios e na ordem dos 100% para todos os nutrientes analisados.

É de referir que com esta espécie não ocorreu a formação de amónia no meio de Fabregas, como se tinha constatado nas espécies anteriores, ou se houve, esta foi em quantidade tão reduzida que não foi detectável com a técnica utilizada.

Embora se tenha verificado uma boa utilização de azoto independentemente da fonte, o crescimento e a produção de biomassa e de pigmentos foram ligeiramente superiores no meio de Fabregas, pelo que este foi seleccionado para ser utilizado como meio de Referencia para o ensaio com o Efluente piscícola.

ENSAIO COM O EFLUENTE

Como no ensaio anterior, a densidade óptica evidência uma boa adaptação da espécie ao meio, mas a densidade celular não. A diferença observada nestes dois parâmetros poderá ser uma consequência de alguma característica desta espécie, pois foi constante nos dois ensaios efectuados. O valor de R^2 foi superior a 0,96 apenas no Efluente com Correção (figura 3.39).

O comportamento da espécie no meio de Referência foi diferente do que se verificou no ensaio anterior, pois neste ensaio no 4º dia de cultura, a taxa de crescimento era igual à do 2º dia, enquanto, que no 1º ensaio a taxa de crescimento aumentou todos os dias à excepção do último dia de cultura. Esta diferença poderá ser consequência de algum problema logístico durante o ensaio relativamente à luz, que como já se referiu, foi um problema constante ao longo de todo o trabalho experimental realizado.

Relativamente à taxa de crescimento constatou-se que o valor mais elevado se verificou no Efluente com Correção nos primeiros dias, sendo depois igualado pelo valor obtido no meio de Referência no 6º dia. É de frisar que no 4º dia o Efluente sem Correção proporcionou uma taxa de crescimento superior à que se verificou em Fabregas, sendo depois muito irregular.

Fazendo uma análise comparativa, relativamente a este parâmetro, com as outras espécies utilizadas em condições semelhantes, podemos constatar que relativamente a *T. suecica* o comportamento apresentado foi análogo, ma medida em que também nesta espécie se verificou instabilidade na taxa de crescimento quando o meio de cultura foi o Efluente.

Embora se constate que a densidade celular final observada foi de apenas 40%, da densidade obtida no meio de Referência, os pigmentos e a biomassa produzidos foram mais elevados do que neste meio. Podemos estar perante uma espécie cuja multiplicação celular não seja muito activa, mas na qual ocorra acumulação de nutrientes, daí que se verifique uma biomassa e pigmentos superiores. Por outro lado, também o aumento de pigmentos poderá ser uma adaptação da espécie à intensidade luminosa pois trabalhos realizados por alguns autores com outras espécies constataram que o aumento da clorofila quando a intensidade luminosa é baixa, é um mecanismo fotoadaptativo das células (DUBINSKY *et al.*, 1986 ; FALKOWSKY *et al.*, 1980,1985).

Neste ensaio ocorreram variações nas dimensões (e biovolume) nomeio de Fabregas, e no Efluente com Correção, sendo o valor mais elevado observado em meio de Fabregas. Estes resultados estão de acordo com a bibliografia consultada, sobre a influência da concentração de nitratos do meio no volume celular.

Os valores de pH observados para esta espécie, estão dentro dos valores esperados para estas condições, atendendo à fonte de azoto do meio: alcalinização em Fabregas e acidez no Efluente.

A taxa de remoção dos nutrientes foi boa nos meios testados para todos os nutrientes. No Efluente sem Correção a microalga removeu apenas cerca de 66% dos nitratos existentes no meio. De qualquer modo, podemos constatar que a remoção de nutrientes do Efluente por parte da espécie, é eficiente .

Comparativamente às outras microalgas utilizadas, ocorrem algumas semelhanças com o comportamento de *T. suecica*, relativamente à remoção de azoto no Efluente. Nesta, a remoção foi superior no Efluente com Correção, relativamente às duas formas de azoto presentes (amónia e nitrato), enquanto que para o *Flagelado* a remoção dos nitratos foi também mais elevada no Efluente com Correção .

Relativamente ao fósforo constata-se que o comportamento foi análogo, na medida em que para ambas as microalgas a maior percentagem de remoção ocorre no Efluente sem Correção relativamente ao Efluente com Correção, sendo no entanto, menor do que a obtida no meio de Referência. No entanto, a remoção efectuada pelo *Flagelado* (97%) foi superior à de *T. suecica* (63%).

Os resultados obtidos neste ensaio levantam algumas questões quanto às exigências nutricionais desta microalga. Provavelmente ela utilizará o azoto independentemente da fonte, amónia ou nitrato, mas dentro de determinadas concentrações.

A concentração de nitratos em meio de Fabregas poderá ser muito elevada e, pelo contrário, a do Efluente muito baixa, sendo este facto no entanto, compensado pela amónia existente no meio e pela correção efectuada. Por outro lado, o comportamento da microalga no Efluente sem Correção é muito irregular, sendo necessário efectuar mais ensaios com esta espécie, com diferentes razões N:P para se tentar detectar qual a razão que proporciona a melhor taxa de remoção.

Os estudos realizados nestes ensaio permitem considerar a hipótese de utilização do Efluente numa perspectiva interessante, sob o ponto de vista ecológico.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo fez-se uma primeira caracterização de uma piscicultura marinha de produção de Pregado (“rodovalho”) em regime intensivo, no norte de Portugal.

Dada a especificidade do trabalho efectuado considera-se mais produtiva a apresentação de considerações finais e não de conclusões, abrangendo dois aspectos fundamentais na estrutura deste trabalho: a caracterização do efluente piscícola e o desenvolvimento de uma metodologia de tratamento por microalgas.

PISCICULTURA ESTUDADA E EFLUENTE CARACTERIZADO

As condições de temperatura e o pH estão adequadas para a espécie cultivada e, os valores de oxigénio embora superiores aos mínimos, são instáveis e poderão levar a situações de stress nos peixes, com reflexos na composição do efluente da unidade.

As variações observadas nas biomassas e consequentemente nas cargas, corresponderam ao funcionamento zootécnico da piscicultura. Daí a dificuldade em se fazer uma avaliação do crescimento em função das condições de cultura.

A caracterização físico-química da piscicultura permitiu ter uma visão mais precisa do regime hidráulico desta. Assim, constatou-se que a piscicultura apresenta os três tipos de regime: aberto, semi-fechado e fechado, embora o mais frequente seja o regime semi- fechado.

A composição do efluente está dependente, por um lado, da fisiologia do animal cultivado e, por outro, da concepção e do funcionamento hidráulico da piscicultura. Assim, a água que abastece a piscicultura, maternidade e engorda, poderá não ser só água do mar, mas sim água resultante da mistura desta, em grau variável, com água recirculada, efectuada no reservatório da piscicultura.

Igualmente existem situações de refluxo de água recirculada para o interior da tubagem de água do mar devido a problemas inerentes à construção. Deste modo é difícil obter uma amostra correspondente à água do mar que abastece a piscicultura.

Como consequência da estrutura física da piscicultura (reservatório onde se misturam água nova e água recirculada e tanques de engorda dispostos em série) a água de entrada nos tanques de engorda é sempre ou quase sempre água carregada em nutrientes. A sua composição variou ao longo do período experimental, como consequência dos diversos regimes hidráulicos observados na piscicultura. Obtiveram-se valores para a amónia e fósforo que oscilaram entre (0,06 e 2,04 mg/L e 0,06 e 0,54 mg/L, respectivamente). Para além disso, a água dos tanques é acrescida, em grau variável de “água nova oxigenada” (água recirculada) para fazer face às necessidades crescentes em água e oxigénio, devidas às variações de biomassa.

O efluente amostrado põe em evidência o aumento da concentração de azoto amoniacal e de fosfatos, detectado em todos os meses. Tendo em mente os condicionalismos acima referidos, a produção média estimada de nutrientes principais para os efluente dos tanques amostrados foi de 117 kg de nitritos, 405 Kg de nitratos, 550 kg de fósforo e 2531 Kg de azoto. Contudo é útil referir os valores instantâneos de concentração observados para os regimes hidráulicos existentes na piscicultura (regime aberto, nitritos 0,17 mg/L, nitratos 0,43 mg/L, fosfatos 0,55 mg/L e amónia 0,99 mg/L; regime semi-fechado, nitritos entre 0,11mg/L e 0,21 mg/L, nitratos entre 0,22 mg/L e 0,93 mg/L fosfatos entre 0,25 e 0,66 mg e amónia 0,68 e 2,14 /L; regime fechado, nitritos 0,18 mg/L, nitratos 0,61 mg/L, fosfatos 0,66 mg/L e amónia 4,90 mg/L).

A razão N:P observada ao longo do período experimental variou entre 5:1 e 18:1, chegando a estar próximo de alguns meios de cultura padrão, como consequência da variação da concentração dos respectivos nutrientes.

No estudo realizado não foi possível estabelecer uma relação entre a produção de amónia e os factores que a influenciam nomeadamente a temperatura da água, a biomassa e o azoto ingerido, devido à interacção simultânea de uma diversidade de factores que actuaram sobre este parâmetro.

Observou-se produção de nitritos e nitratos em alguns meses, provavelmente devido ao tempo de residência da água nos tanques (por ex., 8 horas para o 1º tanque de uma série) à taxa de recirculação (ocorrência de circuito fechado) e à temperatura (valores entre 15 e 17,3°C).

As análises de sólidos em suspensão permitiram confirmar o excesso de areia presente na água bombeada do mar (valor máximo 310 mg/L). Os teores em sólidos suspensos totais são o resultado da força das marés na zona da piscicultura.

A produção em sólidos voláteis foi máxima no efluente, especialmente no mês de Agosto. Supõe-se que os tratamentos químicos para a desinfecção normal da piscicultura, alterando a flora bacteriana da água, poderão ter contribuído para os resultados observados.

A não observação de produção fitoplanctónica na água usada na piscicultura poderá ser explicada pela estrutura física da mesma, nomeadamente a utilização de água recirculada, o tempo insuficiente de permanência da água em cada tanque (mesmo no decantador exterior) e o estado de penumbra na zona de engorda.

ENSAIOS COM MICROALGAS E CAPACIDADE DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES

Numa perspectiva de avaliação das possibilidades de tratamento do efluente caracterizado por microalgas fizeram-se estudos com duas espécies normalmente utilizadas em trabalhos deste tipo, *T. suecica* e *P. tricornutum*.

Contudo dado ser desejável que num sistema de tratamento biológico se utilizem espécies mais adaptadas às características do efluente a tratar, procedeu-se ao

isolamento de uma espécie autóctone, designada por *Flagelado* que pertence muito provavelmente ao género *Tetraselmis*.

O efluente foi utilizado como meio de cultura, tendo-se procurado corrigir as razões N:P:Si de modo a obter uma produção microalgal máxima para uma depuração de nutrientes eficiente. Estas experiências tiveram a duração de apenas oito dias.

Em todos os ensaios observou-se uma não inibição de crescimento devido ao efluente. Contudo, os resultados obtidos variaram de acordo com a espécie utilizada e com as razões entre os nutrientes. Assim:

- Em *P. tricornutum* a densidade celular máxima obtida foi 45×10^4 cel/mL e a taxa de crescimento de 1,19, tendo-se ainda verificado que não é necessária a adição de sílica para o seu desenvolvimento. De notar que com o meio de Referência utilizado a densidade celular foi de 1560×10^4 cel/mL, denotando possivelmente o efeito de uma razão N:P 20:1 relativamente a 18:1, no Efluente.
- Com *T. suecica* a densidade celular máxima, foi de 39×10^4 cel/mL e a taxa de crescimento 0,65. Os valores obtidos representavam cerca de 21% da densidade celular obtida no meio de Referência.
- Para o *Flagelado*, a densidade celular máxima atingiu 45×10^4 cel/mL e a taxa de crescimento 0,84. Esta espécie teve um comportamento muito peculiar pois no Efluente com Correção com amónia (N:P=10:1 para N:P= 20:1), a taxa máxima de crescimento foi observada em menor tempo de cultura (4º dia) relativamente ao meio de referência (6º dia), tendo decaído em seguida. Daí que a densidade celular final observada tenha sido de apenas 40% da do meio de Referência. Contudo, os pigmentos celulares e a biomassa produzida foram os mais elevados.

Relativamente às espécies estudadas ocorreram variações do biovolume celular com os diferentes meios de cultura ensaiados com *T. suecica* e com o *Flagelado* em meio de Fabregas e no Efluente com Correção.

Pôde verificar-se que a densidade óptica constitui um bom parâmetro de avaliação rápida da biomassa celular, pelas elevadas correlações obtidas com a densidade celular, para *P. tricornutum* e para *T. suecica* (à excepção nesta última do meio Efluente Corrigido). Para o *Flagelado* este parâmetro foi excelente para o Efluente Corrigido.

A taxa de remoção de nutrientes azotados e fosfatados, um dos objectivos pretendidos com este trabalho, foi elevada (superior a 90%) para todas as microalgas estudadas. Contudo existem algumas diferenças relacionadas com a espécie utilizada e com as razões e tipo de nutrientes. Assim,

- Para *P. tricornutum* a percentagem de remoção de nitratos duplicou pela correcção do Efluente em sílica.
- Com *T. suecica* a assimilação de nitratos e fosfatos foi sempre inferior no Efluente relativamente ao meio de Referência. A correcção na razão N:P duplicou a taxa de remoção de nitratos e melhorou ligeiramente a remoção de amónia. Contudo a remoção de fosfatos foi sempre inferior usando o efluente.
- Para o *Flagelado* a assimilação de nutrientes foi máxima relativamente às outras espécies estudadas. Exceptua-se a remoção de nitratos no Efluente não corrigido, que registou uma percentagem de 67% de remoção relativamente aos 100% no Efluente corrigido. Este comportamento tem semelhanças com o observado para *T.suecica*.

De ressaltar que ocorreu produção de amónia no meio de Referência com as espécies *P. tricornutum* e *T suecica*, o mesmo não se tendo verificado com o *Flagelado*.

Possivelmente este facto estará relacionado com diferenças na flora bacteriana acompanhantes destas espécies.

Face aos resultados obtidos pode ser apresentado o seguinte resumo de ideias principais extraídas do trabalho efectuado:

- ♦ O efluente de Pregado caracterizado contém nutrientes dissolvidos em quantidades apreciáveis. Estas aparecem principalmente na forma de amónia e fosfatos, embora os nitratos também sejam representativos. Contudo, uma caracterização completa do Efluente não foi conseguida, continuando por conhecer exactamente a contribuição da ureia, para o teor em azoto total do efluente. Também se ignora o seu teor em oligoelementos e vitaminas.
- ♦ Estes efluentes apresentam-se com características físico-químicas favoráveis à produção de microalgas. Como espécies mais interessantes seleccionaram-se *P. tricornutum* e um *Flagelado* autóctone.
- ♦ Contudo, o papel que poluentes como agentes bactericidas e antiparasitários (usados rotineiramente em unidades deste tipo) podem ter num sistema de tratamento biológico do tipo pretendido, é desconhecido.
- ♦ Não obstante, a produção de microalgas a partir destes efluentes permite reduzir ou mesmo eliminar a carga poluente destas águas residuais por uma assimilação de nutrientes dissolvidos. Deste modo, os impactos da piscicultura no meio ambiente poderão ser fortemente reduzidos.
- ♦ Aconselha-se que, numa óptica de optimização da produção fitoplanctónica, e logo da depuração dos efluentes se torna necessário efectuar investigação mais aprofundada sobre a questão da correcção adequada de nutrientes limitantes (macro e micronutrientes). Do mesmo modo, apenas foi iniciado o estudo das características fisiológicas e de produção das espécies microalgais consideradas interessantes do ponto de vista da utilização no tratamento deste tipo de

efluentes. Maior pesquisa deve ser feita sobre o melhoramento das condições de cultura, nomeadamente quanto a um aumento de escala e outros regimes de cultura, estudos *in situ* e eventualmente trabalhos com outras espécies.

- ♦ Como medidas a curto prazo tendentes a melhorar as condições verificadas na piscicultura estudada sugere-se a continuação de estudos tendentes a uma caracterização mais completa do funcionamento hidráulico da mesma, diversificando-se os pontos de amostragem e os parâmetros analisados. Nesta perspectiva, torna-se fundamental a criação de condições para a toma de amostras da água do mar que abastece a piscicultura e a implementação de um sistema simples de decantação da água à entrada, de modo a reduzir *a posteriori* o teor em sólidos suspensos totais da piscicultura.
- ♦ O estudo realizado permite considerar a utilização de efluentes piscícolas numa perspectiva interessante sob o ponto de vista económico e ecológico. Pensa-se que tal deverá passar pela criação de um sistema de aquacultura integrada, em que o azoto e o fósforo produzidos na piscicultura poderão ser utilizados na produção de microalgas, podendo estas por sua vez servir de alimento a rotíferos, artemias ou mesmo outros filtradores como moluscos e peixes. O emprego de um sistema deste tipo permite a recirculação da água, para além de aliviar a carga poluente das descargas para o mar.

Numa perspectiva de desenvolvimento sustentável, esta abordagem é a mais correcta permitindo, do ponto de vista económico, uma diminuição de custos por diminuição das necessidades em água e por um aumento da capacidade de previsão da produção. Do ponto de vista zotécnico, a estabilidade conseguida nas condições ambientais permitirá um melhor crescimento e uma diminuição das perdas metabólicas dos animais cultivados e logo diminuição das cargas poluentes para o meio receptor.

Do ponto de vista social esta solução é atraente para os consumidores, pois o produto assim obtido aparece com excelente qualidade, mais barato e produzido em condições consideradas "amigas" do ambiente. Estará, assim salvaguardado o princípio ambiental abordado no início deste trabalho, Reduzir, Reutilizar e Reciclar, acrescido da mais-valia que representa a Valorização deste tipo de Efluentes.

6. Bibliografia

- ABALDE, J., CID, A., FIDALGO, P., TORRES, E., Y HERRERO, C., 1995. *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Servicio de Publicacions, Universidade da Coruña. 210pp.
- ABELIOVICH, A., 1986. Algae in wastewater oxidation ponds. In: *Handbook of microalgal Mass culture*. Richmond, A. (ed), pp 331-338. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- ALSTED N. S., 1991. Studies on the reduction of discharges from fish farms by modification of the diet. In "Nutritional strategies and aquaculture waste": Proceedings of the first internacional symposium on nutricional strategies of aquaculture waste, 77-89.
- ALVARADO, J. L., 1997 Aquafeeds and the environment In : Feeding Tomorrow's Fish. Proc. Workshop of the CIHEAM Network on Tecnology of Aquaculture in the Mediterranean. 24-36 Junho 1996. A. Tacon & B. Basurco (Editors). Mazarrón, Espanha. *Cahiers Options Mediterranéennes*, 22: 275-289.
- AMINOT, A. et CHAUSSEPIED, M., 1983. *Manuel des Analyses Chimiques en Milieu Marin*. CNEXO, Brest, 394 pp.
- ANTIA, N. J., BERLAND, B. R., BONIN, D. J. and MAESTRINI, S. Y., 1985. Comparative evaluation of certain organic and inorganic nitragen source for phototrophic growth of marine microalgae. *J. Mar. Biol. Ass. UK*. 55: 519-539.
- BALLESTRAZZI, R. G., 1996. Piscicoltura e impatto ambientali. In: *Laguna, Set- Out 1996*. 6-13.
- BARNABÉ, G., 1989- *Aquaculture Volume 2 Techniquit Documentation* - Lavoisier.
- BAUTISTA, C., 1991- *Peces Marinos-Tecnologia de Cultivo*. Ediciones Mundi-Prensa Madrid. 148pp.
- BECKER, E. W., 1994. *Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press. 293 pp.
- BEN-AMOTZ, A. and AVRON, M., 1983. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. In: *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*, NS, vol. 15A. Läuchi, A. and Bielecki, R. L. (eds), pp: 351-375. Springer-Verlag, Berlin.
- BERTL, A., FELLE, H. and BENTRUP, F. W., 1984. Amine transport in *Riccia fluitans*. *Plant Physiol.* 76: 75-78.

BIANCHI, M. A., et MARTIN, Y. P., 1978. Dynamique des populations au cours de deux productions experimentales de phytoplancton marin naturel. *Publ. Sci. Tech. CNEXO : Actes Colloq.*, 7 :323 - 350.

BIENFANG, P. K., 1975. Steady state analysis of nitrate-ammonium assimilation by phitoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 20: 402-411.

BLANQUET, I.,1999. *Restrição alimentar de juvenis de Pregado (Scophtalmus maximus)*. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais. I. C. B. Abel Salazar.

BORGES, M. T. M., 1984. Obtenção de culturas algais em grande escala através de «blooms» induzidos. *Actas IV Simpósio Ibérico de Estudos do Bentos Marinho*. Lisboa. 63-74.

BORGES, M. T. M., and GILMAN, M., 1991. Estudo comparativo da capacidade de produção no exterior, de cinco espécies de microalgas com interesse para aquacultura. *Rev. Biol. U. Aveiro*, 4: 133-143.

BORGES, M. T., e MOREIRA, A. L., 1999. Tratamento e valorização de efluentes agro-industriais. Análise de dois casos de estudo, *Actas da 6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente*. Lisboa, 20-22 de Outubro de 1999. Volume 3:391-400.

BORGES, MT. ,HUUSENOT,J., LEFEBVRES, S., LOBO-FERNANDES,H., SOARES,R., and VILHENA, M. T., 2000. Comparison study of phytoplankton production on two intensive fish-farm effluents of European Atlantic coasts. *In: Aqua 2000. In: Responsible aquaculture the new millenium*. May 2-6, 2000. Nice, France. *European Aquaculture Society Special Publication N° 28*, pag 85.

BONIN,D. J. & MAESTRINI,S. Y.,1981. Importance of organic nutrients for phytoplankton growth in natural environments: implications for algal species sucession. *In Physiological bases of phytoplankton ecology*. Platt, T. (Ed). *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci*, 210.

BOYD, C. E., and MUSIG, Y., 1981. Ortophosphate uptake by phitoplankton and sediment. *Aquaculture*, 72: 247-253.

BREWER, P. C. and GOLDMAN, J. C., 1976. Alkalinity changes generated by phytoplankton growth. *Limmol. Ocanog.* 21 : 108-117.

BROSSARD, N. et HUSSENOT,J., 1997. Matrise de la culture de masse de la diatomee *Skeletonema costatum* en systeme ouvert et continue, sur um millieu en " eau de mer enrichie". *Rapports Internes de la direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer.*, DRV/RA/RST/97-04, 37p.

BUSCHMANN,A. H.,LOPEZ, D. A. & MEDINA,A., 1996 A Review of the Environmental Effectes of Alternative Production Strategies of Marine Aquaculture in Chile. *Aquacultural Engineering*, 15 (6): 397-421.

- CACERES-MARTINES C., CADENA-ROA M. and METAILLER R., 1984. Nutrition requirements of tubot (*Scophthalmus maximus* L.): I: A preliminary study of protein and lipid utilization. *Journal of the World Mariculture Society*, 15: 191-202.
- CID, A., ABALDE, J. y HERRERO, C., 1992a. High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyceae). *J. Appl. Phycol.* 4: 31-37.
- CID, A., ABALDE, J. y HERRERO, C., 1992b. Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Tetraselmis suecica* en cultivos mixotróficos con distintos azúcares y aminoácidos. *Cah Biol. Mar.* 33: 169-178.
- CRAGGS, R., J., MCAULEY, P. and SMITH V. J., 1997- Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. *Water Research*, 31 (7):1701-1707.
- CRESSWELL, R. C and SYRETT, P. J., 1981. Uptake of nitrate by marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Exp. Bot.* 32: 19-25.
- DE PAUW, N., 1982. Microalgae for aquaculture and wastewater treatment. *Seminar Ecotecnologías para el Desarrollo de Mexico*. Mexico D. F, 1-5.
- DE PAUW, N., and PERSOONE, G., 1988. Microalgae for aquaculture. In: *Microalgae Biotechnology*. Ed: Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. Cambridge University Press, 197-221.
- DICKSON, M. W., 1987. Pilot-scale cultivation of microalgae as na ingredient for fish feed in Zambia. *Aquaculture Fish. Manag.* 18: 109-120.
- DIONISIO, M. L., TSUZUKI, K, and MIYACHI, S., 1989. Light requirement for carbonic anhydrase induction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant cell Physiol.* 30: 188-200.
- DOSDAT, A., 1992. L' excretion chez les poissons Téléostéens. I Azote. *La Pisciculture Française*. N° 108:25-40.
- DOSDAT, A., 1992. L' excretion chez les poissons Téléostéens. II Phosphore. *La Pisciculture Française*. N° 109:18-29
- DOSDAT, A., GAUMET, F., and CHARTOIS, H., 1995. Marine Aquaculture Effluent Monitoring: Methodological Approach to the Evaluation of Nitrogen and Phosphorus Excretion by Fish. *Aquaculture Engineering*, 14 :59-84
- DOSDAT, A., SERVAIS, F., MÉTAILLER R., HUELVAN, C., and DESBRUYÈRES, E., 1996. Comparison of nitrogenous losses in five teleost fish species. *Aquaculture*, 141 :107-127.

DOSDAT, A., MÉTAILLER, R., TETU, N., SERVAIS, F., CHARTOIS, H., HUELVAN, C., and ESBROYÈRES, E., 1996. Nitrogenous excretion in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L), under controlled conditions. *Aquaculture Research*, 26, 639-650.

DRÉANNO C., 1994. *Etude du rôle des apports protéiques, lipidiques et glucidiques chez le juvénile de turbot (Scophthalmus maximus L.)*. Mémoire de D. E. A. de biologie et d'agronomie, mention biologie aquacole, Université de Rennes I, France, 34p.

DROOP, M. R., 1969. Algae. In: *Methods in Microbiology*. Norris, J. R. & Pibbons, D. W. (Eds), 3B. Academic Press, London.

DUBINSKY, Z., FALKOWSKI, P. G and WYMAN, K., 1986. Light harvesting and utilization by phytoplankton. *Plant Cell Physiol.* 27: 1335-1349.

DUMAS, A., LALIBERTÉ, G., LESSARD and DE LA NOÛE, J., 1998. Biotreatment of fish farm using the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Aquacultural Engineering*, 17: 57-68.

DUNSTAN, W. M. and TENORE, K. R., 1972. intensive outdoor culture of marine phytoplankton enriched with treated sewage effluent. *Aquaculture* 1: 181-192.

EDWART, J. W. and PRUDER, G. D., 1981. Comparative growth of *Isochrysis galbana* Parke and *Isochrysis aff galbana*, Clone T-Isso- at four temperatures and three light intensities. *J. World Maricul. Soc.*, 12 (1): 347-353.

FABREGAS, J. P., ABALDE, J. HERRERO, C., CABEZAS, B. & VEIGA M., 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42: 207-215.

FABREGAS, J. P., HERRERO, C., CABEZAS, B. & ABALDE, J., 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 49: 231-244.

FABREGAS, J. P., ABALDE, J. and HERRERO, C., 1989. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen, concentration as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, 82: 289-304.

FERNANDEZ-REIRIZ, M. J., PEREZ-CAMACHO, A., FERREIRO, M. J. BLANCO, J., PLANAS, M., CAMPOS, M. J. and LABARTA, U., 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83: 17-37.

FOLKE, C. and KAUTSKY, N., 1992. Aquaculture with its environment: prospects for sustainability. *Ocean and Coastal Management*, 17: 5-24.

FORSBERG J. A. and SUMMERFELT R. C., 1992. Effects of temperature on diel ammonia excretion of fingerling walleye. *Aquaculture* 102: 115-126.

FIDALGO, J. P., LOPEZ-MUÑOZ, I., CID, A., HERRERO, C. y ABALDE, J., 1990. Incidencia de la fuente de nitrógeno sobre la producción de biomasa y composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* em cultivos massivos. *Actes III Congresso Nac. Acuicult.* :651-656.

GAUMET F., 1994. *Contribution à l'étude des capacités d'adaptation au milieu e de croissance du turbot (Scophthalmus maximus L.) en fonction des facteurs écologiques, salinité et temperature.* Thèse de trisième cycle, spécialité Sciences Biologiques, Université de Rennes I, 190p.

GOLDMAN, J. C., 1976. Identification of nitrogen as a growth-limiting nutrient in wastewaters and coastal marine waters trough continuous culture algal assays. *Water Research*, 10: 97-114.

GOUVEIA, A., 1998. *Relatório sobre o Programa, os conteúdos e os métodos de ensino teórico e prático da disciplina de Aquacultura.* Provas de Agregação no âmbito do Departamento de Zoologia e Antropologia. Porto

GUILLARD, R. L., 1972. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animals.* Smith, W and Chanley, M. (eds). Plenum Press.

HANDY R. D. AND POXTON M. G., 1993. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogen compounds by marine fish. *Fish Biology and Fisheries*, 3: 205-241.

HERRERO, C., CABEZAS, B., ABALDE, J., y FABREGAS, J., 1985. *Avances en tecnologia de microalgas para nutricion animal.* Servicio de Publicaciones, Universidade de Santiago de Compostela.

HERRERO,C., CID, A., FABREGAS, J. and ABALDE, J., 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important microalgae with different culture media. *Aquaculture Engineering*, 10 :99-110.

HOPKINS. S. J., SANDIFER. P. A. and BROWDY. C. L., 1993. Sludge management in intensive pond culture of shrimp: Effect of management regime on water quality, sludge characteristics, nitrogen extinction, and shrimp productions. *Aquaculture Engineering*. 13: 11-30.

HUSSENOT, J. , BROSSARD,N., LEFEBVRE, S. et BENET, A., 1995- Traitement par lagunage des effluent d' une pisciculture marine intensive: qualité des eaux et des sédiments. "La qualité de l'eau". *Actes de Colloque*, Ifremer, Nantes.

HUSSENOT, J., 1998. L'eau et l'aquaculture en marais salé selon le niveau d'intensification: besoins quantitatifs et modifications qualitatives. In: Hussenot, J. Buchet, V. (Ed). *Marais maritimes et aquaculture*. Actes de Colloques, 19: 171-179. Ifremer, France.

JOBLING M., 1981. Some effects of temperature, feeding na body weigt on nitrogenous excretion in young plaice *Pleuronectes platessa* L. . J. Fish Biol. 18: 87-96

KAKUTA I., NAMBA K., UEMATSU K., TAKABA M. and MURACHI S., 1992. Changes in urine properties of cultured Red Sea bream exposed to diluted seawater. *Nipon Suisan Gakkaishi* 58: 1465-1469

KAPLAN, D., COHEN, Z. and ABELIOVICH, A., 1986A. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass* 9: 37-48.

KAUSHIK, S. J., 1980. Influence of nutricional sattus on the daily patterns of nitrogen excretion in the carp (*Cyprinus carpio* L.) and the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) Repro. Nutr. Devp., 20(6) : 1751-1756.

KAUSHIK S. J. and COWEY C. B., 1991. Dietary factors affecting nitrogen excretion by fish. In "Nutricional strategies and aquaculture waste": Proceedings of the first internacional symposium on nutricional strategies in *Management of Aquaculture Waste*, 3-19.

KELLY, L. A., BERGHEIM A., and HENNESSY M. M. ., 1994. Predicting output of ammonium from fish farms. *Water Research*, 28: 1403-1405.

Kikuchi k., TADEKA S., HONDA H. and KIYONO M., 1991 Effect o feeding on nitrogen excretion of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Nipon Suisan Gakkaishi* 57, 2059-2064

LAING, I. and AYALA, F., 1990. Commercial mass culture techniques for producing microalgae. In: *Introdution to Applied Phycology*. Akatsuka, I. (ed), pp: 447- 477. SPB Academic Publishing Bv, The Hague.

LAING, I. and HELM, M., 1981. Factors affecting the semi-continuos production of *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. in 200-L vessels. *Aquaculture*, 22: 137-148.

LALIBERTE, G., PROULX, D., DE PAUW, N. and NOUE, J., 1994. Algal technology in wastewater tratment. In: *Algae and water pollution*. *Archiv fur hidrobiologie*, Vol. 42. Rai, L. C. ;Gaur, J. P. & Soeder, C. J. (Ed).

LEFEBVRE, S. et HUSSENOT, J., 1996. Traitement biologique des effluents d'une pisciculture marine intensive : Recherche et mise au point de culture continue de diatomées. *Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture- C. N. R. S.* -

LEFEBVRE, S., HUSSENOT, J. and BROSSARD, N., 1996- Water treatment of land - based fish farm effluents by outdoor culture of marine diatoms. *Journal of Applied Phycology*.

LEMARIÉ, G., MARTIN J. L. M., DUTTO, G. and GARIDOU, C., 1999. - Nitrogenous and phosphorous waste production in a flow-through land-based farm of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat. Living Resour*, 11 (4): 247-254.

LE ROUX, I., 1993. L'aquaculture au sein de la Communauté Economique Européenne. *Aquaculture et Environnement*, Nantes, Octobre, 1993, *Actes de colloques -16-* Brest-Ed. L'Ifremer,: 41-52.

LOPEZ MUÑOZ, I., CID A., FIDALGO, J. P. y HERRERO, C., 1990. Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* cultivada com diferentes intensidades de luz. *Actas do III Congresso Nac. Acuicult.* : 657-662.

LOURENÇO, S. O., MARQUEZ, U. M., MANCINI-FILHO, J., BARBARINO, E. and AIDAR, E., 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture*, 148: 153-168.

MAESTRINI S. Y., ROBERT J. M., 1981. Rendements d'utilisation des sels nutritifs et variations de l'état des cellules de trois diatomées de claires à huîtres de Vendée. *Oceanol. Acta* 4 81) 13-21.

METCALF and EDDY, INC., 1991- *Wastewater Engineering. Treatment Disposal-Reuse*. 3rd Ed. MacGraw- Hill Internat. Ed. Civil Engineering Series. 1334p.

MOREAU, C., PALES-ESPINOSA E. et ROBERT, J. M., 1998- L'azote ammoniacal total: facteur forçant de la fertilité potentielle des eaux souterraines salées de la baie de Bourgneuf pour les microalgues. In Hussenot, J. Buchet, N (eds), *Marais Maritimes et Aquaculture*. Actes Colloques -19. Editions Ifremer, 127-140.

MORALES, J. C., 1991- *Aquicultura Marina Animal*. Ediciones Mundi-Prensa. 3ª ed. 600p.

MOREIRA, L. M. M., 1996. *Avaliação das possibilidades de aproveitamento de efluentes piscícolas marinhos e de dois subprodutos da indústria alimentar para a produção de microalgas marinhas*. Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada, F. C. U. P.

MORRIS, I., 1974. Nitrogen assimilation and protein synthesis. In: *Algal Physiology and Biochemistry*. Steward, W. D. P. (ed), pp: 583-609. Blackwell Scientific Pub. Oxford.

MORTAIN-BERTRAND, A., DESCOLAS-GROS, C. and JUPIN, H. 1987. Stimulating effect of light-to-dark transitions on carbon assimilation by marine diatom. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 112: 11-26.

MOZES, N. and GORDIN, H., 1992. The ecological impact of aquaculture and its alleviation. *Israel workshop on mariculture and the environment*. Ed. Kissil, G. Wm & Saar, I.

NAEGEL, L. C. A., 1977. Combined production of fish and plants in recirculating water. *Aquaculture*, 10: 17-24.

NEORI, A. and KROM, M., D., 1996. Seweed biofilters as regulators of water quality in integrated fish-seaweed culture units. *Aquaculture*. 141: 183-199.

NIELSON, A. H. and LARSON, T., 1980. The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiol. Plant.* 48: 542.

NIJHOF M., 1991. Effects of body weight on diet requirements of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). with special reference to feed intake and body composition. In " fish nutrition in practise", Biarritz, 1991 June 24-27. *Les Colloques* N° 61, Ed. INRA, Paris 1993.

NIJHOF M., 1993 Research on the nutrition and growth in the culture of post larval turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Presented at the *World Aquaculture Conference and Exhibition*, May 25-27, Torremolinos, Spain.

OLIVEIRA, J. F. S., 1995. *A lagunagem em Portugal. Conceitos básicos e aplicações práticas*. Universidade Lusófona Ed. Lda. 516 p.

OSBORNE, B. A. AND RAVEN, J. A., 1986. *Br. Phycol. J.*, 21: 303-313.

OSWALD, W. J., 1988. Micro-algae and wast-water treatment. In: *Micro-algal Biotechnology*. Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. (Ed). Cambridge University Press.

OTERO, A., 1994. *Modificação da composição bioquímica de microalgas marinhas em regime de ciclostato*. Tese de Doutoramento. Universidade de Santiago de Compostela.

PARSONS, T. R., STEPHENS, K. and STRICKLAND, J. D. H., 1961. On the chemical composition of eleven species of phytoplankters. *J. Fish Res. Can.* 18: 1001-1016.

PAULSON L. J., 1980. Models of ammonia excretion for brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 1421-1425.

PERSON - LE RUYET, J., BAUDIN - LAURENCIN, F., DEVAUCHELLE, N., MÉTAILLER R., NICOLAS, J., ROBIN, J. and GUILLAUME, J., 1991- Culture of turbot (*Scophthalmus maximus*)

Handbook of Mariculture. Volume II. Finfish Aquaculture. James, P. McVey (Editor). CRC Press, Boca Raton:21-41.

PERSON-LE RUYET J., 1992. L'élevage du turbot en Europe. *La Pisciculture Française* N° 112.

PERSON - LE RUYET, J., DELBARD, C., CHARTOIS, H. et LE DELLIOU, H., 1997. Toxicity of ammonia to turbot juveniles: 1. Effects on survival, growth and food utilisation. *Aquat. Living Resour.* 10 :307-314.

PILLAY, T. V. R., 1992 *Aquaculture and the Environment*. Fishing News Books. Osney Mead. Oxford., 190pp.

POXTON M. D. and ALLOUSE S. B., 1987. Cyclical fluctuation in ammonia and nitrite-nitrogen resulting from feeding of turbot, (*Scophthalmus maximus* L.) in recirculating systems. *Aquacultural Engineering* 6: 301-322.

QUILLERE, I., MARIE. D. ROUX, L., GOSSE, F. and MOROT-GAUDRY, J. F., 1993. Artificial productive ecosystem based on fish/bacteria/plant association. I. *Design and Manag. Agric. Ecosyst. Environ.*, 47: 13-30.

RAKOCY, J. E., HARGREAVES, J. A and BAILY, D. S., 1989. Effect of hydroponic vegetable production on water quality in a closed recirculation system. *J. World Aquaculture. Soc.* . 20: 64A.

RAVEN, J. A. 1988. Limits to growth. In: *Microalgal Biotechnology*. Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. (Eds). . Cambridge University Press. pp. 257-287.

RENNERT, B. and DREWS, M. S., 1989. A possibility of combined fish and vegetable production in greenhouses. *Adv. Fish. Sci.* 8: 19-27.

RICHMOND, A B., 1986. Cell response to environmental factors. In: *Handbook of microalgal Mass culture*. Richmond, A. (ed): 285-338. CRS Press Inc. Boca Raton, florida.

RODRIGUES, A. M. e SANTANA, F. J., 1993. Tratamento de águas residuais por microalgas. *Bol. UCA : U. Algarve, UCTRA*, 1 : 582 - 599.

RUYTERS, G., 1988. Effects of blue light on enzymes. In: *Blue light effects in Biological Systems*. Senger, H. (ed), pp: 283-301. Springer-Verlag. Berlin.

SANTINHA, M. M., NORONHA, P. M., e VIEIRA, M. N., 1996. Caracterização da variação da qualidade da água num sistema semi- intensivo de produção de dourada (*Sparus aurata* Lineu, 1758). *5ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente*. Aveiro, 1996. 2: 1361-1370.

SAVITZJ., ALBANESE E., EVINGER M. J. and KOLASINSKI P., 1977. Effects of ratio level on nitrogen excretion, nitrogen retention and efficiency of nitrogen utilization for growth in large mout's bass (*Micropterus salmoides*). *J. Fish Biol.* 11: 185-192.

SERVAIS, F., 1994- *Caracterisation des rejets azotes engendres par le jeune turbot, *Scophthalmus maximus* L. Comparation avec d'autres espèces d'interet aquacole.* Ifremer Memoires de fin d'etudes. Centre de Brest. 92pp.

SHIREMAN, J. V. and CICHRA, C. E., 1994. Evaluation of aquaculture effluents. *Aquaculture*, 123: 55-68.

SHPIGEL, M., LEE, J. SOOHO, B. FRIDMAN, R. y GORDIN, H., 1993a. Use of effluent water from fish ponds as a foos source for the pacific oyster *Crassostrea gigas* T. . *Aquaculture and Fisheries Management*, 24: 529-543.

STRICKLAND, J and PARSONS, T., 1972. *A Pratical Handbook of Seawater Analysis.* Bulletin 167, 2. ed. *Fisheries Research Board of Canada.* Ottawa. 310pp.

SYRETT, P. J., 1981. Nitrogren Metabolism of Microalgae. *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*- Trevor Platt (ed) - *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Science.* Bulletin 210.

SYRETT, P. J., 1987. Nitrogen assimilation by eucaryotic algae. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism.* Ullrich, W. R., Aparicio, P. J. Syrett, P. J. and Castillo, F. (ed), pp: 25-31. Springer-Verlag. Berlin.

SPECTOROBA, L. V., GORONKOVA, O. I., NOSOVA, L. P. and ALBISKAYA, O. N., 1982. High density culture of marine microalgae: promising items for mariculture. *Aquaculture* 26: 289-302.

SUTTON, R. J. and LEWIS W. M., 1982. Further observation on a fish production system that incorporates hydroponically grown plants. *Prog. Fish-Cult.* 44: 55-59.

TERLIZZI, D. E., Jr. and KARLANDER, E. P., 1980. Growth of a cocoid nanoplankter (*Eustigmatophyceae*) from the Chesapeake Bay as a influenced by light, temperature, salinity and nitrogen source in factorial combination. *J. Phycol.* 16: 364-368.

TÉTU, N., 1996. *Utilisation de l' Azote, du Phosphore et de la Matière Organique pour le Juvenil du Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) : Essai de modélisation à partir de l' aliment, la taille et la température.* Thèse por Le diplome d'état de Docteur Vétérinaire. Faculté de Medicine de Nantes.

TOVAR, A., MORENO, C., MANUEL - VEZ, M. and GARCIA - VARGAS, M., 2000. Environmental Impact of intensive aquaculture on marine waters. *Water Research* 34,(1):34-342.

ULLRICH, W. R., 1987. Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: Mechanism and relationship with nitrate metabolism. *In: Inorganic Nitrogen Metabolism*. Ullrich, W. R., Aparicio, P. J., Syrett, P. J. & Castillo, F, p: 32-38, Springer-Verlag, Berlin.

VAN RIJIN, J., 1996- The potencial for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture - a review. *Aquaculture*, 139: 181-201.

WALSH, G. E., 1988. *Environ. Toxicology. Chem.*, 7: 979-987.

WHEATON F. W., 1977. *Aquacultural Engineering*, Wiley, New York, 708p.

WHEATON F., HOCHHEIMER, J. and KAISER, G. E. 1991. Fixed film nitrification filters for aquaculture, *In: D. E. Brune and J. R. Tomasso (editors), Aquaculture and Water Quality. World Aquaculture. Soc. Baton Rouge LA. pp 272-303.*

WIKFORS, G. H., 1986. altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture* 59: 1-14.

WYNNE, D. and RHEE, G. Y., 1986. Effects of light intensity and quality on the relative N and P requirement (the optimum N:P ratio) of marine planktonic algae. *J. Plankton Res.* 8: 91-103.

ZWIEG, R. D. ., 1986. An integrated fish culture hydroponic vegetable production system. *Aquacult. Manag.* 12: 34-40.

OUTRAS

Endereços de pesquisa efectuada na Internet

VEGA, 1998 <http://www.cibnor.mx/malgas/etet-1.html>

DECRETOS

Decreto Lei n.º 268/98 de 8 de Agosto de 1998. Anexos XIII e XV.

Decreto Lei n.º 261/89 de 17/08/89,

Decreto Lei n.º 152/97 de 19 de Junho de 1997